

ERYTHROZYTÄRE, THROMBOZYTÄRE  
UND HLA-ANTIKÖRPER IN DER  
SCHWANGERSCHAFT –  
EINE HÄUFIGKEITSANALYSE  
IN GYNÄKOLOGISCHEN PRAXEN

**Dissertation**  
**zur Erlangung des akademischen Grades**

*doctor medicinae (Dr. med.)*

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich – Schiller – Universität Jena**

**von: Katja Ulrike Pfeiffer**

**geboren am: 14.05.1985 in Weimar**

**Gutachter**

- 1.
- 2.
- 3.

**Tag der öffentlichen Verteidigung:**

## Abkürzungsverzeichnis

A	Erythrozytenoberflächenantigen A
A <sub>1</sub>	Erythrozytenoberflächenantigen A <sub>1</sub>
A <sub>2</sub>	Erythrozytenoberflächenantigen A <sub>2</sub>
Abb	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APGAR	Score zur Bewertung der Vitalfunktionen bei Neugeborenen
Aqua dest	Aqua destillata
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
B	Erythrozytenoberflächenantigen B
C	Erythrozytenoberflächenantigen C
c	Erythrozytenoberflächenantigen c
CD	Cluster of Differentiation
D	Erythrozytenoberflächenantigen D
E	Erythrozytenoberflächenantigen E
e	Erythrozytenoberflächenantigen e
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FNAIT	fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie
HLA	Human Leukozyte Antigen
HNA	Human Neutrophil Antigen
HPA	Human Platelet Antigen
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
LCT	Lymphozytotoxischer Test
Le <sup>a</sup>	Erythrozytenoberflächenantigen Lewis a
Le <sup>b</sup>	Erythrozytenoberflächenantigen Lewis b
MAIPA	Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigen
MHN	Morbus haemolyticus neonatorum

MNS	erythrozytäres Antigensystem (Antigene M, N, S, s)
NaCl	Natriumchlorid
NAIT	neonatale Alloimmunthrombozytopenie
neg	negativ
0	Erythrozytenoberflächenantigen 0
o. B.	ohne pathologischen Befund
P <sub>1</sub>	Erythrozytenoberflächenantigen P <sub>1</sub>
Pat	Patient
PCR	Polymerase Chain Reaction
pos	positiv
PRA	Pannelreaktive Aktivität
Rh	Rhesus
SSW	Schwangerschaftswoche
Tab	Tabelle
U	Umdrehungen
unspez.	unspezifisch
VSD	Ventrikelseptumdefekt
zw	zwischen

### **verwendete SI-Einheiten:**

°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
g	Fallbeschleunigung
GPT/l	Giga-Parts pro Liter
l	Liter
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
min	Minuten
µmol/l	Mikromol pro Liter
mmol/l	Millimol pro Liter
nm	Nanometer
TPT/l	Tera platet pro Liter
upm	Umdrehungen pro Minute

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>3</b>
1.1 VORBEMERKUNGEN .....	3
1.2 FETO-MATERNALE INKOMPATIBILITÄTEN .....	4
1.2.1 <i>Morbus haemolyticus neonatorum</i> .....	4
1.2.1.1 Rhesus-Erythroblastose .....	4
1.2.1.2 AB0-Erythroblastose .....	6
1.2.1.3 Erythroblastosen durch andere Antikörper .....	7
1.2.2 <i>Fetale und Neonatale Alloimmunthrombozytopenie</i> .....	8
1.2.3 <i>HLA-Inkompatibilität</i> .....	10
<b>2 ZIELE DER ARBEIT .....</b>	<b>12</b>
<b>3 METHODIK .....</b>	<b>13</b>
3.1 PROBANDENREKRUTIERUNG UND UNTERSUCHUNGSPROTOKOLL .....	13
3.2 UNTERSUCHUNGSMATERIAL .....	15
3.3 GERÄTE UND CHEMIKALIEN .....	15
3.4 SOFTWARE .....	19
3.5 AB0-BLUTGRUPPEN- UND RH-FORMELBESTIMMUNG .....	19
3.6 BESTIMMUNG ERYTHROZYTÄRER ANTIKÖRPER .....	21
3.6.1 <i>Erythrozyten-Antikörper Suchtest</i> .....	21
3.6.2 <i>Erythrozyten-Antikörper Differenzierung</i> .....	22
3.6.3 <i>Titerbestimmung erythrozytärer Antikörper</i> .....	23
3.7 BESTIMMUNG VON HLA-ANTIÖRPERN .....	23
3.7.1 <i>HLA-Antikörper Suchtests: LCT, QUIKSCREEN<sup>®</sup>, B-SCREEN<sup>®</sup></i> .....	23
3.7.2 <i>Titerbestimmung von HLA-Antikörpern</i> .....	26
3.7.3 <i>LABScreen<sup>®</sup> Mixed und LABScreen<sup>®</sup> HLA Klasse I und II Singles</i> .....	26
3.8 BESTIMMUNG THROMBOZYTÄRER ANTIKÖRPER .....	27
3.8.1 <i>PAK<sup>®</sup> 2-LE</i> .....	27
3.8.2 <i>PAKPLUS<sup>®</sup></i> .....	28
3.8.3 <i>Indirekter MAIPA-Assay</i> .....	29
3.9 STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	32
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>33</b>
4.1 HÄUFIGKEIT VON ERYTHROZYTÄREN, THROMBOZYTÄREN UND HLA-ALLOANTIÖRPERN IN DER SCHWANGERSCHAFT .....	33
4.2 BEEINFLUSSUNG DES SCHWANGERSCHAFTSVERLAUFS DURCH ALLOANTIÖRPER .....	36
4.2.1 <i>Beeinflussung des Schwangerschaftsverlaufs durch HLA-Antikörper</i> .....	37

4.2.2	<i>Beeinflussung des Schwangerschaftsverlaufs durch thrombozytäre Antikörper</i> .....	37
4.2.3	<i>Beeinflussung des Schwangerschaftsverlaufs durch gleichzeitiges Vorliegen von Thrombozyten- und HLA-Antikörpern</i> .....	38
4.3	HÄUFIGKEIT VON THROMBOZYTEN- UND HLA-ALLOANTIKÖRPERN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZAHL VORHERGEHENDER SCHWANGERSCHAFTEN .....	39
4.3.1	<i>HLA-Antikörper in Abhängigkeit von der Zahl vorhergehender Schwangerschaften</i> .....	39
4.3.2	<i>thrombozytäre Antikörper in Abhängigkeit von der Zahl vorhergehender Schwangerschaften</i> ....	42
4.3.3	<i>Thrombozyten- und HLA-Antikörper in Abhängigkeit von der Zahl vorhergehender Schwangerschaften</i> .....	44
4.4	HÄUFIGKEIT VON THROMBOZYTEN- UND HLA-ALLOANTIKÖRPERN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZAHL VORHERGEHENDER ABORTE .....	45
4.4.1	<i>HLA-Antikörper in Abhängigkeit von der Zahl vorhergehender Aborte</i> .....	46
4.4.2	<i>thrombozytäre Antikörper in Abhängigkeit von der Zahl vorhergehender Aborte</i> .....	47
4.4.3	<i>Thrombozyten- und HLA-Antikörper in Abhängigkeit von der Zahl vorhergehender Aborte</i> .....	49
4.5	DARSTELLUNG VON TITERVERLÄUFEN AUSGEWÄHLTER FÄLLE .....	49
4.6	STATUS DER NEUGEBORENE VON MÜTTERN MIT HLA- BZW. HPA-ANTIKÖRPERN .....	54
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>58</b>
5.1	HÄUFIGKEIT VON ERYTHROZYTÄREN, THROMBOZYTÄREN UND HLA-ALLOANTIKÖRPERN IN DER SCHWANGERSCHAFT .....	58
5.1.1	<i>Häufigkeit erythrozytärer Antikörper</i> .....	60
5.1.2	<i>Häufigkeit von HLA-Antikörpern</i> .....	61
5.1.3	<i>Häufigkeit thrombozytärer Antikörper</i> .....	62
5.2	BEEINFLUSSUNG DES SCHWANGERSCHAFTSVERLAUFS DURCH ALLOANTIKÖRPER .....	64
5.2.1	<i>Beeinflussung des Schwangerschaftsverlaufs durch HLA-Antikörper</i> .....	65
5.2.2	<i>Beeinflussung des Schwangerschaftsverlaufs durch thrombozytäre Antikörper</i> .....	69
5.2.3	<i>Beeinflussung des Schwangerschaftsverlaufs durch gleichzeitiges Vorliegen von Thrombozyten- und HLA-Antikörpern</i> .....	70
5.3	HÄUFIGKEIT VON THROMBOZYTEN- UND HLA-ALLOANTIKÖRPERN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZAHL VORHERGEHENDER SCHWANGERSCHAFTEN .....	70
5.3.1	<i>HLA-Antikörper in Abhängigkeit von der Zahl vorhergehender Schwangerschaften</i> .....	70
5.3.2	<i>thrombozytäre Antikörper in Abhängigkeit von der Zahl vorhergehender Schwangerschaften</i> ....	72
5.4	HÄUFIGKEIT VON THROMBOZYTEN- UND HLA-ALLOANTIKÖRPERN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZAHL VORHERGEHENDER ABORTE .....	72
5.4.1	<i>HLA-Antikörper in Abhängigkeit von der Zahl vorhergehender Aborte</i> .....	73
5.4.2	<i>thrombozytäre Antikörper in Abhängigkeit von der Zahl vorhergehender Aborte</i> .....	74
5.5	DISKUSSION AUSGEWÄHLTER TITERVERLÄUFE .....	75
5.5.1	<i>Anstieg des Antikörpertiters im Verlauf der Schwangerschaft</i> .....	75
5.5.2	<i>Abfall des Antikörpertiters im Verlauf der Schwangerschaft</i> .....	76
5.5.3	<i>Zeitpunkt des erstmaligen Antikörnernachweises</i> .....	77
5.6	STATUS DER NEUGEBORENE VON MÜTTERN MIT HLA- BZW. HPA-ANTIKÖRPERN .....	78

6	SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	84
7	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS.....	86
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	99
9	TABELLENVERZEICHNIS .....	100
10	ANHANG .....	101

## Zusammenfassung

Durch feto-maternale Inkompatibilität ausgelöste Krankheitsbilder zählen insgesamt zu den selteneren pädiatrischen Behandlungsanlässen, jedoch brillieren sie durch potentiell schwerstgradige Folgen bis hin zu letalen Ausgängen.

Die von feto-maternalen Inkompatibilitäten ausgehende Gefahr wird bisher unterschätzt. Lediglich Mismatches in erythrozytären Antigenensystemen wurde soviel Bedeutung zugerechnet, dass in den Mutterschaftsrichtlinien entsprechende Antikörper Suchtests verankert worden sind. Dass Antikörper gegen kindliche Thrombozytenantigene bzw. HLA etwa genauso häufig auftreten und mindestens genauso schwere, wenn nicht noch erheblich gravierendere Folgen haben können, findet in den gängigen Leit- und Richtlinien keinen Eingang, obwohl mittlerweile auch hierfür effiziente Tests und Therapieoptionen entwickelt wurden.

In der durchgeführten Studie wurde das Auftreten von thrombozytären, erythrozytären und HLA-Antikörpern erfasst. Weiterhin wurden Beziehungen zwischen Antikörperhäufigkeit und vorausgehenden Schwangerschaften bzw. Aborten untersucht. Mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson wurden die ermittelten Zusammenhänge auf Signifikanz geprüft.

Bei 20,4% (n=21) der untersuchten 103 schwangeren Frauen konnten Antikörper im Serum nachgewiesen werden. Erythrozytäre Antikörper wurden nicht gefunden. Der als Bestätigungstest für das Vorliegen von HLA-Antikörpern dienende LABScreen® Mixed lieferte in 19,4% (n=20) der untersuchten Fälle ein positives Ergebnis. Bei 3,9% (n=4) der Probandinnen ließen sich mit Hilfe des indirekten MAIPA-Assays gegen thrombozytäre Antigene gerichtete Antikörper finden. Das relative Risiko für die Ausbildung thrombozytärer Antikörper war bei vorliegenden HLA-Antikörpern etwa 12,5-mal höher, als bei Frauen ohne HLA-Antikörper. Eine Erhöhung der Abortrate durch das Vorliegen von Alloantikörpern konnte nicht nachgewiesen werden.

Durch Anwendung der Alpha-Adjustierung nach Shaffer, modifiziert nach Holm, konnte gezeigt werden, dass Primagravidae signifikant seltener HLA-Antikörper aufweisen, als Frauen mit vorhergehenden Schwangerschaften. Ähnliches ergab sich bei der Betrachtung thrombozytärer Antikörper: Diese wurden signifikant häufiger in



der Gruppe der Multigravidae gefunden, als bei Frauen mit weniger oder gar keinen Vor-Schwangerschaften.

Zwischen der Anzahl früherer Aborte und der Auftretenswahrscheinlichkeit von HLA-Antikörpern zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang. Jedoch ist das relative Risiko für HLA-Antikörperbildung bei Frauen mit habituellen Aborten signifikant 4,4-mal höher, als bei Frauen, die noch nie einen Abort hatten. Auch für den Zusammenhang zwischen thrombozytären Antikörpern und der Anzahl früherer Aborte ergab sich keine Signifikanz. Das relative Risiko für die Ausbildung von HPA-Antikörpern bei Frauen mit habituellen Aborten ist jedoch signifikant 13,2-mal höher, als bei Frauen ohne früheren Abort.

Dass den nachgewiesenen Antikörpern feto-maternale Inkompatibilitäten zugrunde liegen, ist sehr wahrscheinlich, kann jedoch mit den angewandten Methoden nicht endgültig belegt werden. Hierfür sind weiterführende serologische Untersuchungen sowie die Genotypisierung der entsprechenden Antigene bei Eltern und Kindern nötig.

Fest steht, dass die potentiell letalen Folgen maternaler Alloantikörper für das Kind nur durch adäquate und frühzeitige Diagnostik sowie durch Einleitung entsprechender Therapiemaßnahmen abgewendet werden können. Allein aus diesem Grund sollte der Stellenwert der Alloantikörperdiagnostik in der gynäkologischen Praxis überdacht werden. Die in der Studie ermittelten Faktoren, die das Risiko der Antikörperbildung beeinflussen, könnten in der Praxis für die schnellere Erfassung besonders gefährdeter Schwangerschaften genutzt werden.

# 1 Einleitung

## 1.1 Vorbemerkungen

„Durch die ärztliche Betreuung während der Schwangerschaft und nach der Entbindung sollen mögliche Gefahren für Leben und Gesundheit von Mutter oder Kind abgewendet sowie Gesundheitsstörungen rechtzeitig erkannt und der Behandlung zugeführt werden. Vorrangiges Ziel der ärztlichen Schwangerenvorsorge ist die frühzeitige Erkennung von Risikoschwangerschaften und Risikogeburten“, so heißt es in den einführenden Worten der Mutterschaftsrichtlinien. Unter Risikoschwangerschaften und Risikogeburten werden dabei Schwangerschaften verstanden, „bei denen aufgrund der Vorgeschichte oder erhobener Befunde mit einem erhöhten Risiko für Leben und Gesundheit von Mutter oder Kind zu rechnen ist“. Dazu zählen unter anderem der Zustand nach „wiederholten Aborten oder Frühgeburten“, ein „Totgeborenes oder geschädigtes Kind“ sowie das Vorliegen einer „Blutgruppen-Inkompatibilität“ (Mutterschaftsrichtlinien des G-BA 1985). Weiterhin besagen die Richtlinien, dass nur Maßnahmen angewendet werden sollen, „deren diagnostischer und vorbeugender Wert ausreichend gesichert ist“. Dass fetomaternale Blutgruppen-Inkompatibilitäten eine Gefährdung für Mutter und Kind bedeuten können, ist demnach begründet.

Doch wie verhält es sich mit Unverträglichkeiten, die durch Alloantikörper gegen andere Antigensysteme ausgelöst werden können? Wie nachfolgend am Beispiel der HLA- und HPA-Antikörper dargestellt, können diese ebenfalls schwerwiegende Folgen für den Schwangerschaftsverlauf und das Kind haben.

Ein routinemäßig durchgeführter Suchtest, wie er für die erythrozytären Antikörper seit langem besteht, ist bisher nicht in den Mutterschaftsrichtlinien verankert, obwohl effiziente Testverfahren zur Verfügung stehen. Zudem bestehen heutzutage gute therapeutische Möglichkeiten, derartige Alloantikörper zu eliminieren.

Die vorliegende Arbeit hat es sich daher zum Ziel gesetzt, den Stellenwert der HLA- und HPA-Alloantikörperdiagnostik in allgemein-gynäkologischen Praxen zu erörtern.

## **1.2 Feto-maternale Inkompatibilitäten**

### **1.2.1 Morbus haemolyticus neonatorum**

Alle beschriebenen Formen des Morbus haemolyticus neonatorum beruhen ursächlich auf einer Antikörperbildung der Mutter gegenüber kindlichen Blutgruppenantigenen. Dieser Immunisierungsprozess kann ausgelöst werden, wenn kindliche Erythrozyten, welche Oberflächenantigene tragen, die auf den mütterlichen Erythrozyten nicht vorkommen, in den Kreislauf der Mutter gelangen. Die entstandenen Antikörper können, sofern sie vom IgG-Typ sind, diaplazentar in die fetale Zirkulation eingeschwemmt werden und sich dort an die entsprechenden Oberflächenantigene auf den Erythrozyten heften. Die Folge ist ein beschleunigter Erythrozytenabbau im retikuloendothelialen System. Schwere und Ausprägungsgrad des Morbus haemolyticus neonatorum werden bestimmt durch die Konzentration der mütterlichen IgG-Antikörper und deren Subklassentyp, durch die Antigendichte und -verteilung auf den fetalen Erythrozyten sowie fetalerseits durch die Phagozytosekapazität, das Ausmaß der Bilirubinausscheidung sowie die Aktivität der Erythropoese (Mueller-Eckhardt und Kiefel 2004). Die embryonale Blutbildung setzt ungefähr drei Wochen post conceptionem ein. Normalerweise sind mütterlicher und fetaler Kreislauf durch den Synzytiotrophoblasten von einander getrennt. Wird dieser beschädigt, kann es entsprechend dem Druckgradienten zum Übertritt fetaler Blutzellen in die mütterliche Zirkulation kommen. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten derartiger feto-maternaler Transfusionen nimmt im Verlauf der Schwangerschaft zu (Behrens und Schneider 2000).

#### **1.2.1.1 Rhesus-Erythroblastose**

Im Falle eines Morbus haemolyticus neonatorum durch Rhesusinkompatibilität bildet eine Rhesus-negative Mutter Anti-D Antikörper. Auslöser für die Immunisierung sind meist Einschwemmungen größerer Mengen fetalen Blutes bei vorangegangenen Schwangerschaften, zum Beispiel unter der Geburt, bei Aborten bzw. Schwangerschaftsabbrüchen, im Rahmen von Amnio- und Kordozentesen oder bei

geburtshilfflichen Manipulationen. Die Wahrscheinlichkeit einer Sensibilisierung ist dabei abhängig von der Zahl der übertragenen Erythrozyten. Nach Behrens und Schneider führt eine Transfusion von 0,1ml in 3% zur Sensibilisierung. Nach Übertragung von 1ml ist damit sogar in 15% der Fälle zu rechnen. Besteht zwischen Mutter und Kind zusätzlich eine AB0-Inkompatibilität, ist das Risiko für eine Immunisierung gegenüber Rhesus-Antigenen geringer, da in die mütterliche Zirkulation übergetretene fetale Erythrozyten durch Kontakt mit den entsprechenden maternalen Isoagglutininen beschleunigt abgebaut werden. Die Alloantikörperbildung erfolgt nach Erstkontakt recht langsam: Erst nach ungefähr 16 Wochen lassen sich die entsprechenden Antikörper nachweisen (Behrens und Schneider 2000). Das klinische Bild reicht von der Anaemia neonatorum – einer milden Anämie – über schwere Anämien mit Hyperbilirubinämien bis zum Hydrops fetalis mit Ödemen, Pleura- und Perikardergüssen sowie Aszites (Mueller-Eckhardt und Kiefel 2004).

Pränatal gibt es mehrere Therapieoptionen: Durch Plasmapherese kann die Antikörperkonzentration im mütterlichen Serum reduziert werden, nach Behrens und Schneider sogar um bis zu 75% (Behrens und Schneider 2000). Ein Rebound-Phänomen der Antikörperbildung ist nach einigen Wochen möglich. Die Gabe von IgG an die Mutter soll den diaplazentaren Übertritt der Antikörper bzw. den Abbau der antikörperbeladenen fetalen Erythrozyten blockieren (Mueller-Eckhardt und Kiefel 2004). Eine dritte Therapiemöglichkeit stellen intrauterine Transfusionen dar. Dem Fetus werden dabei Erythrozyten der Blutgruppe 0d in die Nabelvene injiziert. Je nach Schwere der Anämie bzw. der Abbaugeschwindigkeit der Erythrozyten im retikuloendothelialen System muss dieses Prozedere alle ein bis vier Wochen wiederholt werden (Behrens und Schneider 2000).

Die postpartale Behandlung umfasst zwei Säulen: Ziel der Phototherapie (425-475nm) ist die Bildung wasserlöslicher Bilirubinmetabolite in der Haut, welche dann über Galle und Harn des Neugeborenen ausgeschieden werden können. Bei höhergradiger Anämie oder Hyperbilirubinämie bzw. gleichzeitig vorliegenden Faktoren, die einen Kernikterus begünstigen (z. B. Hypoxie, Azidose, Unreife, Hypoglycämie, Hypoproteinämie und Hirnblutung), kann eine Austauschtransfusion nötig werden (Behrens und Schneider 2000).

In den Mutterschaftsrichtlinien des Bundesausschusses der Ärzte und Krankenkassen ist festgelegt, dass bei jeder Schwangeren zu einem möglichst

frühen Zeitpunkt der Schwangerschaft Blutgruppe und Rhesus-Faktor bestimmt sowie ein Suchtest auf erythrozytäre Antikörper durchgeführt werden. Letzterer ist bei jeder Schwangeren zwischen der 24. und 27. SSW zu wiederholen. Jeder Rhesus-negativen Schwangeren, die noch keine Anti-D Antikörper gebildet hat, wird zwischen der 28. und 30. Schwangerschaftswoche eine Standarddosis von 300µg Anti-D Immunglobulin verabreicht. Hierdurch sollen, eventuell in die mütterliche Zirkulation übergetretene, fetale Erythrozyten eliminiert werden. Weiterhin muss post partum bei jedem Kind einer Rhesus-negativen Mutter unverzüglich der Rhesus-Antigenstatus geklärt werden. Falls das Neugeborene das Antigen D exprimiert, ist der Mutter innerhalb von 72h post partum eine weitere Standarddosis Anti-D Immunglobulin zu injizieren. Kommt es bei einer Rhesus-negativen Frau zur Fehlgeburt bzw. wird ein Schwangerschaftsabbruch durchgeführt, müssen ebenfalls innerhalb von 72h nach dem Eingriff 300µg Anti-D Immunglobulin appliziert werden (Mutterschaftsrichtlinien des G-BA. 1985). Vor Einführung der Rhesusprophylaxe waren Blutgruppeninkompatibilitäten für 10% der perinatalen Mortalität verantwortlich (Bowman 1997). Durch Einführung der Anti-D-Prophylaxe konnte die Immunisierung gegenüber Rhesusantigenen um 90% reduziert werden. Die Häufigkeit der Rhesus-Erythroblastose liegt heute bei etwa 50 Fällen auf 100 000 Geburten (Eckstein 2005). Verantwortlich dafür sind unter anderem die unterlassene Anti-D-Prophylaxe nach gynäkologischen Eingriffen und die zunehmende Einwanderung aus Ländern, in denen keine routinemäßige Prophylaxe erfolgt (Behrens und Schneider 2000). In einer Arbeit von Maas wurden trotz prä- und postpartaler Anti-D-Prophylaxe 9 von 8063 (0,11%) rhesusnegativen Frauen immunisiert (Maas 1992). Eine mögliche Ursache dafür ist, dass die Wirkung des applizierten Anti-D Immunglobulins nur 12 Wochen anhält. Nachinjektionen können bei fortbestehender Schwangerschaft nötig sein (Behrens und Schneider 2000).

### **1.2.1.2 AB0-Erythroblastose**

Eine AB0-Erythroblastose kann bei Schwangeren mit der Blutgruppe 0 auftreten, deren Feten die Blutgruppe A oder B haben. Normalerweise sind Isoagglutinine Immunglobuline vom IgM-Typ. Durch exogene Einflüsse (z. B. durch Darmparasiten) bzw. den Übertritt kindlicher Erythrozyten in die mütterliche Zirkulation kann jedoch

die Bildung von maternalen IgG-Isoagglutininen ausgelöst werden (Gadner et al. 2005). Diesen Isoagglutinine vom IgG-Typ ist es möglich, die Plazenta zu überqueren und an entsprechende fetale Oberflächenantigene zu binden.

Im Gegensatz zum Morbus haemolyticus durch Rhesus-Inkompatibilität tritt die AB0-Erythroblastose – aufgrund der bei Trägern der Blutgruppe 0 stets vorhandenen Isoagglutinine – nicht selten bereits in der ersten Schwangerschaft auf. Die Häufigkeit liegt bei ungefähr 1:125 Neugeborenen und damit deutlich über der, des durch Rhesusantikörper ausgelösten Morbus haemolyticus neonatorum (Mueller-Eckhardt und Kiefel 2004). Der klinische Verlauf stellt sich dagegen mit leichter Anämie und prolongiertem Neugeborenenikterus deutlich milder dar. In den meisten Fällen ist eine Behandlung mittels Phototherapie ausreichend. Nur sehr selten sind Austauschtransfusionen nötig (Gadner et al. 2005).

Eine intrauterine Anämie ist aufgrund der initial nur geringen Ausprägung der AB0-Antigene auf den fetalen Erythrozyten selten (Mueller-Eckhardt und Kiefel 2004). Dies ist auch der Grund dafür, dass ein MHN infolge von AB0-Inkompatibilität bei Frühgeborenen eine Rarität ist. Bereits 1964 deckte Schellong diese Tatsache in seiner Arbeit „Über den Einfluss mütterlicher Antikörper des AB0-Systems auf Reticulocytenzahl und Serumbilirubin bei Frühgeborenen“ auf (Schellong 1964).

### ***1.2.1.3 Erythroblastosen durch andere Antikörper***

Weinstein gibt in seinen Untersuchungen an, dass mehr als 43 verschiedene erythrozytäre Oberflächenantigene mit der hämolytischen Erkrankung des Neugeborenen in Verbindung gebracht werden können (Weinstein 1982). Am häufigsten ist die Immunisierung gegen das Antigen c, deren Folgen ähnlich gravierend wie die des Morbus haemolyticus neonatorum durch Anti-D Antikörper sein können (Eckstein 2005). Antikörper gegen kindliche Kell-, Duffy-, MNS-, Kidd- oder Lutheran-Antigene werden ebenfalls häufig beschrieben und können schwere Erythroblastosen verursachen (Geifman-Holtzman 1997). Die Antigene P<sub>1</sub>, Le<sup>a</sup> und Le<sup>b</sup> scheinen dies nicht zu tun, da die hiergegen gebildeten Antikörper fast immer der Klasse IgM angehören und daher die Plazentaschranke nicht überwinden können (Eckstein 2005).

Allgemeine Leitlinien zur Therapie einer Erythroblastose durch Nicht-Anti-D Antikörper existieren aufgrund ihrer Seltenheit nicht. Oft wird ein ähnliches Vorgehen wie beim rhesusbedingten Morbus haemolyticus neonatorum beschrieben.

Lediglich für die Kell-Alloimmunisierung wird ein abgewandeltes Therapiemanagement favorisiert (Kenneth und Moise 2000). Der MHN durch Anti-Kell Antikörper nimmt eine Sonderstellung ein, da diese Antikörper neben einer fetalen Anämie auch eine Hemmung der fetalen Erythropoese auslösen und somit die kompensatorische Steigerung der Blutbildung zum Ausgleich einer Anämie eingeschränkt ist (Bowman et al. 1992). Trotz schwerer Anämie sind die Retikulozyten und Normoblasten nicht erhöht, die Hyperbilirubinämie ist milder (Vaughan et al. 1998). Anti-Kell Antikörper sind für 10% der MHN-Fälle verantwortlich und zählen damit nach den Anti-D Antikörpern zu den häufigsten Antikörpern, die hämolytische Erkrankungen verursachen (Bowman et al. 1992).

### **1.2.2 Fetale und Neonatale Alloimmunthrombozytopenie**

Eine fetale bzw. neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT) kann entstehen, wenn sich auf den fetalen Thrombozyten Antigene befinden, welche auf den maternalen Thrombozyten nicht vorkommen. Gelangen die kindlichen Thrombozyten in den Kreislauf der Mutter, wird diese gegen das entsprechende Antigen immunisiert. Kommt es zur Bildung von IgG-Antikörpern, können diese die Plazenta passieren und mit den passenden Antigenen auf den fetalen Thrombozyten Antigen-Antikörper-Komplexe bilden. Die mit Antikörpern beladenen Thrombozyten werden daraufhin im retikuloendothelialen System abgebaut, was eine Thrombozytopenie mit oder ohne Blutungsneigung zur Folge hat (neonatale alloimmune Thrombozytopenie). Von einer Thrombozytopenie spricht man, wenn die Plättchenzahl unter  $150 \times 10^9/l$  sinkt. Klinische Symptome sind ab einer Zahl kleiner  $50 \times 10^9/l$  zu erwarten (Jhawar et al. 2003). Sie können sich unter anderem als petechiale Blutungen, Hämatome an mechanisch belasteten Stellen, Melaena neonatorum oder gar als intrazerebrale Blutungen manifestieren (Mueller-Eckhardt und Kiefel 2004). Letztere tritt bei 11% (Bussel et al 2005) bis 26% (Spencer und Burrows 2001) aller FNAIT-Fälle auf und manifestiert sich bei 50% der Betroffenen bereits in utero (ab der 20. SSW, meist jedoch nach der 28. – 30. SSW) (Mueller-

Eckhardt und Kiefel 2004). Mögliche Folgen können ein Fruchtabort oder lebenslange neurologische Einschränkungen des Kindes sein.

Im Gegensatz zu der oben beschriebenen Rhesus-Inkompatibilität tritt die FNAIT oft bereits in der ersten Schwangerschaft auf. Die Angaben zur Häufigkeit der FNAIT variieren: Mueller-Eckhardt und Kiefel geben die Inzidenz klinisch manifester FNAIT-Fälle mit 1:2000 bis 1:5000 an (Mueller-Eckhardt und Kiefel 2004), Dreyfus et al. sprechen von einem Fall auf 1000 Lebendgeburten (Dreyfus et al. 1993). In unserer Bevölkerung liegt dabei in etwa 78% der Fälle ein Antikörper gegen HPA 1a vor. In ca. 20% finden sich Anti-HPA 5b Antikörper (Bessos und Seghatchian 2005). Nach Proulx kann nicht von der Titerhöhe im mütterlichen Serum auf die Schwere der NAIT geschlossen werden (Proulx 1994). Zur Abschätzung der in der fetalen Zirkulation vorliegenden Antikörpermenge sind daher Cordozentesen (Marzusch et Schnaidt 1995) bzw. Fruchtwasseruntersuchungen nötig. Neben den Antigenen des HPA-Systems können auch HLA der Klasse I sowie vermutlich die Erythrozytenantigene A und B, welche sich ebenfalls auf der Thrombozytenoberfläche befinden, Auslöser einer Immunisierung der Mutter und somit Ursache einer FNAIT sein (Taaning 2000). In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass gegen HPA 1a immunisierte Frauen häufig Träger der HLA-Antigene B8 und DR3 sind. Das Vorliegen dieses Haplotyps wird als Marker für die Immunantwort auf HPA 1a gewertet (Beckmann et al. 2002).

Über das prä- und postnatale FNAIT-Management herrscht nach wie vor Uneinigkeit. Ansätze stellen die intravenöse IgG-Gabe an die Mutter bzw. die intrauterine Applikation von kompatiblen Thrombozytenkonzentraten dar. Gerade durch letzteres kann die Blutungsgefahr deutlich gesenkt werden (Giers et al. 2010). Mueller-Eckhardt und Kiefel bezweifeln die Wirksamkeit der hochdosierten präpartalen IgG-Gabe an die Mutter. Ihrer Meinung nach kann durch suffiziente fetale Thrombozytensubstitution eine erfolgsversprechende Blutungsprophylaxe bewirkt werden (Mueller-Eckhardt und Kiefel 2004).



### 1.2.3 HLA-Inkompatibilität

Bestehen Inkompatibilitäten zwischen mütterlichem und fetalem HLA-Oberflächenantigenmuster, können – basierend auf denselben pathophysiologischen Mechanismen, wie bereits für erythrozytäre und thrombozytäre Antikörper beschrieben – HLA-Antikörper gebildet werden und gegebenenfalls diaplazentar in die kindliche Zirkulation übertreten. Ihre Häufigkeit ist abhängig von der Zahl vorhergehender Schwangerschaften, wie Tabelle 1 (Terasaki et. al. 1970) zeigt.

**Tabelle 1: Häufigkeit von HLA-Antikörpern in der Schwangerschaft**

TABLE 1. Occurrence of cytotoxic antibodies in parous women

No. of pregnancies	No. of women	No. of women with antibodies	No. of women with possible antibodies	No. of women without antibodies	Percentage of women with antibodies
0	20	0	2	18	0.0
1	24	4	4	16	16.7
2	106	25	23	58	23.6
3	89	32	19	38	36.0
4	110	49	14	47	44.5
5	95	41	15	39	43.2
6	46	29	3	14	63.0
7	44	19	8	17	43.2
8	27	16	1	10	59.3
≥9	33	16	4	13	48.5
Total	594	231	93	270	

In der von Terasaki durchgeführten Studie traten in der Gruppe der erstmals schwangeren Frauen keine Antikörper auf, in der Gruppe mit einer vorhergehenden Graviddität dagegen in 16,7% der Fälle. Bei Frauen, die bereits dreimal schwanger waren, wurden in 36% der Fälle HLA-Antikörper gefunden (Terasaki et al. 1970). Einen ähnlichen Trend fanden auch Harris und Lordon: In ihrer Untersuchung waren 71% der HLA-Antikörper positiven Frauen Multiparae (Harris und Lordon 1976). Die Bedeutung von HLA-Antikörpern in der Schwangerschaft wird noch immer diskutiert. Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von HLA-Antikörpern und kongenitalen Anomalien (Terasaki et al. 1970) bzw. Plazenta- und Geburtsgewicht (Warburton et al. 1971) konnten nicht eindeutig bestätigt werden (Balasch et al. 1981). Harris und Lordon fanden in ihrer Studie eine (nicht-signifikante) Häufung von Präeklampsie und fetalem Disstress in der Gruppe HLA-Antikörper positiver Frauen (Harris und Lordon 1976). Gesicherte Daten, die den Zusammenhang zwischen maternalen HLA-

Antikörpern und dem Abortrisiko beschreiben, liegen nicht vor (Marzusch und Steck 1998 sowie Balasch 1981). Zahlreiche Forschungsgruppen gehen mittlerweile sogar von einem positiven Einfluss der gegen paternale Lymphozyten gerichteten mütterlichen Alloantikörper aus (Tempfer 2000). Der Nachweis von HLA-Antikörpern gegen väterliche HLA-Antigene (primär im maternalen Serum gebildet oder sekundär durch Gabe paternaler Lymphozyten induziert) kann die Wahrscheinlichkeit einer Lebendgeburt für eine Frau mit habituellen Aborten erhöhen (Orgad 1999). Auch eine Metaanalyse von Porter konnte 2006 den Nutzen der paternalen Immuntherapie belegen (Porter et al. 2006). Dieser Sachverhalt hat bereits Eingang in die Leitlinien der AWMF gefunden: In „speziellen Fällen“ spricht man sich hier für eine immunmodulatorische Therapie aus (AWMF 015/050). In anderen Arbeiten, zum Beispiel in der von Eichler, wurde festgestellt, dass sich der Verlauf eines Anti-D bedingten Morbus haemolyticus neonatorum in Anwesenheit von HLA-Antikörpern milder gestaltet (Eichler et al. 1995). Vermutet wird, dass das fetale Phagozytosesystem durch den Abbau von HLA-Antigen-Antikörperkomplexen blockiert ist und so die Zerstörung der mit Anti-D beladenen Erythrozyten verzögert bzw. vermindert wird (Dooren et al. 1993). Der Zusammenhang zwischen HLA-Alloantikörpern und neonataler Thrombozytopenie war bereits Thema zahlreicher Untersuchungen und wird weiterhin kontrovers diskutiert. In dem Review „HLA Antibodies and Fetomaternal Alloimmune Thrombozytopenia: Myth or Meaningful“ konnte kein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von HLA-Antikörpern und dem Auftreten einer NAIT gefunden werden (Taaning 2000). Chow veröffentlichte dagegen 1992 einen Fall von neonataler Thrombozytopenie, welche durch Anti-HLA A2 ausgelöst wurde (Chow et al. 1992). Moncharmont konnte in seiner Arbeit ebenfalls HLA-Alloantikörper als Ursache einer NAIT, welche klinisch durch Petechien in Erscheinung trat, nachweisen (Moncharmont et al. 2004). Auch die Casereports von Sasaki (Sasaki et al. 2001), del Rosario (del Rosario et al. 1998) und Gramatges (Gramatges et al. 2009) beschreiben fetale und neonatale Thrombozytopenien, ausgelöst durch HLA-Alloantikörper. Thude veröffentlichte 2006 den Fall einer NAIT durch Anti-HLA B27 Antikörper (Thude et al. 2006). Schleussner berichtet sogar über die erfolgreiche Immunadsorption eines HLA B7 Antikörpers aus dem Serum einer Frau, welche zuvor zwei Kinder aufgrund schwerer Thrombozytopenien verloren hatte (Schleussner et al. 2009).

## 2 Ziele der Arbeit

Dass feto-maternale Inkompatibilitäten potenziell letale Folgen für den Feten haben können, ist seit vielen Jahren allgegenwärtig. Bereits im Jahr 1953 beschrieb Harrington die immunologischen Grundlagen der neonatalen Alloimmunthrombozytopenie (Harrington et al. 1953). Mit Hilfe der therapeutischen Apherese besteht heute die Möglichkeit, die Gefahr einer fetalen bzw. neonatalen Alloimmunthrombozytopenie sowie eines Morbus haemolyticus neonatorum durch hochtitrige maternale Alloantikörper zu vermindern. Um betroffene Frauen dieser Therapie zuführen zu können, muss das Krankheitsbild durch den betreuenden Gynäkologen in Betracht gezogen und mit entsprechenden laborchemischen Verfahren nachgewiesen werden.

In der Literatur findet man unzählige Einzelfalldarstellungen zu diesem Thema. Untersuchungen an für die Grundgesamtheit repräsentativen Kohorten sucht man vergebens. Aus diesem Grund ist es das Ziel dieser Promotionsarbeit, die Häufigkeit von erythrozytären, thrombozytären und HLA-Antikörpern im Serum schwangerer Frauen aus allgemein-gynäkologischen Sprechstunden zu analysieren. Mit Hilfe retrospektiver Aufarbeitung der Schwangerschaftsverläufe sollen zudem Aussagen zur Aborthäufigkeit unter Antikörperträgerinnen bzw. Nicht-Antikörperträgerinnen getroffen werden. Weiterhin werden mögliche Zusammenhänge zwischen der Zahl vorhergehender Schwangerschaften bzw. Aborte und der Ausbildung von Antikörpern eruiert. Diese Ergebnisse sollen einen Beitrag dazu leisten, einen für die Ausbildung feto-maternaler Inkompatibilitäten besonders gefährdeten Personenkreis einzugrenzen.

Da in den letzten Jahren neue Antikörper Nachweisverfahren etabliert wurden, ist unserer Meinung nach eine Überarbeitung dieser Thematik nötig, um neue Diagnostik- und Therapiestrategien entwickeln zu können. Unter Einbezug aktueller Literatur soll der Stellenwert der dargestellten Antikörperdiagnostik in der gynäkologischen Praxis diskutiert werden.

### **3 Methodik**

#### ***3.1 Probandenrekrutierung und Untersuchungsprotokoll***

Die durchgeführte Studie entspricht in ihrem Studiendesign einer prospektiven Kohortenstudie. Die Kohorte „schwangere Frauen aus allgemein-gynäkologischen Praxen“ wurde während des Schwangerschaftsverlaufs hinsichtlich des Auftretens von erythrozytären, thrombozytären und HLA-Antikörpern untersucht. Der Umfang der Kohorte beziffert sich auf 103 Probandinnen im Alter zwischen 17 und 42 Jahren. Die Auswahl der teilnehmenden Frauen erfolgte zufällig durch die Gynäkologen der fünf teilnehmenden Praxen, wobei Frauen, die eine sofortige Interruption veranlassten, nicht einbezogen wurden.

Nach sorgfältiger Aufklärung und Einverständniserklärung erfolgte die erste venöse Vollblutentnahme (zwei Nativblutmonovetten á 10ml) innerhalb der ersten 13 Schwangerschaftswochen. Mit dem Kurier des Labors Löbel/Retzlaff gelangte das Material zur Untersuchung in die Blutbank des Universitätsklinikums Jena.

Konnten in der ersten Probe mit den in Abbildung 1 gezeigten Suchtests keine Antikörper gefunden werden, erfolgte lediglich zwischen der 24. und 28. SSW eine weitere Blutentnahme (Abb. 1). Wurde auch in dieser zweiten Blutprobe kein Antikörper nachgewiesen, war die Untersuchung der Probandin an dieser Stelle abgeschlossen.

Trat im QUIKSCREEN<sup>®</sup>, B-SCREEN<sup>®</sup> oder MAIPA ein positives Ergebnis auf, folgte die Titerbestimmung des Antikörpers. Diese wurde zu (mindestens) einem späteren Zeitpunkt der Schwangerschaft wiederholt. Gleichzeitig wurden die anderen Antikörper Suchtests erneut durchgeführt, um die eventuelle Bildung zusätzlicher Antikörper nicht zu übersehen.

Um detailliertere Aussagen über die Titerverläufen treffen zu können, wurden engmaschige Titerkontrollen angestrebt. Dies war in der Praxis leider schwer umsetzbar, da die meisten Probandinnen zusätzlichen Blutentnahmen ablehnend gegenüberstanden.

Alle Seren, welche in den HLA-Antikörper Suchtests positiv reagierten, wurden im Nachgang mit einer zweiten, nicht auf der ELISA-Technik beruhenden Methode,

untersucht. Der auf der Luminex®-Technologie basierende LABScreen® Mixed diente als Bestätigungstest. Mit LABScreen® HLA Klasse I und Klasse II Singles war anschließend eine Differenzierung der Antikörper möglich.

Blutgruppe und Rhesus-Formel wurden nur einmal pro Probandin bestimmt.

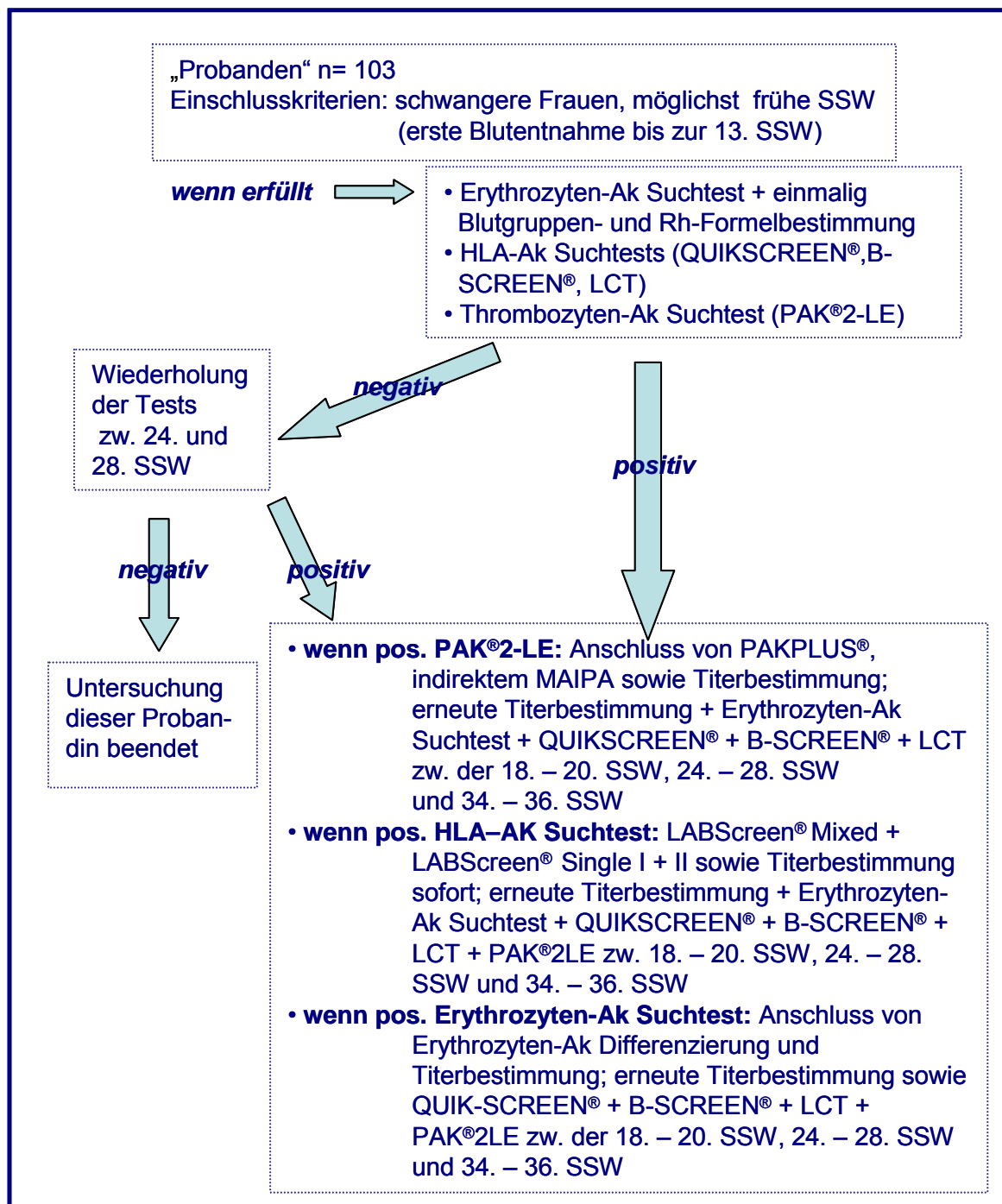


Abbildung 1: Untersuchungsprotokoll

Von den teilnehmenden Probandinnen wurde zu Studienbeginn ein Fragebogen ausgefüllt. Dieser beinhaltete, neben Angaben zur Zahl vorhergehender Schwangerschaften und Geburten, auch Fragen zu früheren Aborten und Interruptiones sowie zu Vorerkrankungen, Dauermedikation, früheren Operationen und Transfusionen.

Nach Beendigung der Schwangerschaft erfolgte eine retrospektive Befragung der betreuenden Gynäkologen zum Verlauf der Schwangerschaft sowie zu schwerwiegenden peri- und postpartalen Komplikationen seitens der Neugeborenen. Weiterhin wurden bei Kindern, deren Mütter HLA- bzw. HPA-Antikörper im Serum aufwiesen, die Krankenblätter aus den jeweiligen Geburtskliniken hinsichtlich postpartaler Besonderheiten studiert.

Die Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena hat in ihrer Sitzung vom 25.10.2007 der Durchführung dieser Studie zugestimmt und erhebt aus ethischer Sicht keine Bedenken.

### **3.2 Untersuchungsmaterial**

Das gewonnene venöse Vollblut wurde bei Eintreffen im Labor sofort in Zentrifugenröhrchen überführt und 5min bei 4,4g zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Serums wurden zwei Drittel davon bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. So konnte eine gewisse Probenzahl angesammelt und später in einem Arbeitsgang bearbeitet werden.

### **3.3 Geräte und Chemikalien**

- *Handschuhe*
- *Abseren:*
  - Zentrifugenröhrchen
  - Zentrifuge.....Zentrifuge 5702, Eppendorf

- *ABO- und Rh-Formelbestimmung*

12x8 Loch Mikrotiterplatten

Reagenzglasständer

Reagenzgläser

Einmalpipetten

NaCl

Lichtplatte.....JUST Normlicht GmbH

Zentrifuge.....DiaCent-DW, DiaMed

Rh – Kontrolllösung.....Medion Diagnostics GmbH

Anti – A Serum.....SIFIN A – 11H5, SIFIN Berlin

Anti – B Serum.....SIFIN B – 6F9, SIFIN Berlin

Anti – D Serum.....human monoklonal klon RGM – 1, IMMUCOR GAMMA

Anti – D Serum.....IgM – Anti – D MS – 201, Medion Diagnostics AG

Anti – C Serum.....Klon MS – 273, SD – nostik

Anti – C Serum.....Klon MS – 24, Biolith Diagnostica

Anti – c Serum.....Klon MS – 35, SD – nostik

Anti – c Serum.....Klon MS – 33, Biolith Diagnostica

Anti – E Serum.....Klon MS – 12, SD – nostik

Anti – E Serum.....Klon MS – 80, Biolith Diagnostica

Anti – e Serum.....Klon MS 62, SD – nostik

Anti – e Serum.....Klon MS – 16, Biolith Diagnostica

B – Testerythrozyten.....Referenzzelle B, Immucor Inc.

A<sub>1</sub> – Testerythrozyten.....Referenzzelle A<sub>1</sub>, Immucor Inc.

A<sub>2</sub> – Testerythrozyten.....Referenzzelle A<sub>2</sub>, Immucor Inc.

0 – Testerythrozyten.....Referenzzelle 0, Immucor Inc.

- *Erythrozyten-Antikörper Suchtest, Differenzierung und Titerbestimmung*

Reagenzglasständer

Reagenzgläser

Einmalpipetten

NaCl

Diluent 2 .....DiaMed ID

Bromelin .....DiaMed ID

Pipette.....20-200 µl Pipette, Eppendorf

Liss/Coombs – Gelkarte .....DiaMed ID

NaCl/Enzymst/Kälteagglutin – Karte .....DiaMed ID

Inkubator.....ID – Inkubator 37 SI, DiaMed ID

Lichtplatte.....JUST Normlicht GmbH

Zentrifuge .....ID – Centrifuge 24S, DiaMed ID

Testerythrozytenpanel.....DiaMed ID

- *LCT*

6-fach Mikroliterspritzenkamm

Monomultipipette

saugfähige Papiertücher

Kühlschrank

Komplement

Brutschrank.....Memmert

Sera Screen FCT 60 Platte.....BAG

Fluoreszenzmikroskop..... Axiovert 25,Zeiss

Aqua dest.....Braun/Melsung

Zellzuchtpuffer.....Sinfin

FluoroQuench™ ..(enthält Ethidiumbromid und Acridinorange, Vorsicht! beide sind mutagen)

- *QUIKSCREEN®*, *B-SCREEN®*, *Titerbestimmung*

Eppendorf Gefäße

Probenständer

Papiertücher

Pipetten

QUIKSCREEN® QS 12 G.....GTI

B-SCREEN® .....GTI

Photometer.....TECAN, Spectra SLT

Computer.....Panasonic

Computer.....Fujitsu Siemens

Aqua dest.....Braun/Melsung

Brutschrank.....Memmert

- *PAK®2-LE und PAKPLUS®*

Eppendorf Gefäße

Probenständer

Pipetten

Papiertücher

PAK®2-LE.....GTI

PAKPLUS® .....GTI

Photometer.....TECAN, Spectra SLT

Computer.....Panasonic

Aqua dest.....Braun/Melsung

Brutschrank.....Memmert



- *indirekter MAIPA*

Eppendorf Gefäße

Reagenzglasständer

Reagenzgläser

Einmalpipetten

Kühlschrank

NaCl

Aqua dest.....Braun/Melsung

Zentrifuge.....BIOFUGE pico, Heraeus

Brutschrank.....Mettler

Mikrotiterplatten .....655061, Greiner

Absauggerät.....DURAN 1000ml, Schott

Schwefelsäure.....H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Merck

Wasserstoffperoxid.....H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

OPD – Tabletten 2mg .....Dako

Ziege – Anti – Maus – Antikörper.....Dianova

Peroxidase – Konjugat.....Dianova

Testzellpanell.....DiaMed

CD41.....MM2/356, Linaris MAK 04 685

CD61.....PM6/13, Linaris MAK 07 28

CD42a.....FMC – 25, Linaris MAK 05 94

CD42b.....SZ2, Immunotech 0409

CD49b.....Gi9, Immunotech 0717

β<sub>2</sub> – Mikroglobulin.....B1G6, Immunotech 0114

CD29.....MAR4, Pharmingen 30861A

CD36.....SM0, Linaris MAK 07 22

CD36.....FA6 – 152, Immunotech 07 65

CD36.....CB38, Pharmingen 30981A

Thrombozytenwaschlösung 1.....Klinikapotheke

Thrombozytenwaschlösung 2.....Klinikapotheke

Coatingpuffer.....Klinikapotheke

PBS – BSA 2%.....Klinikapotheke

TBS – Waschpuffer.....Klinikapotheke

Solubilisierungspuffer.....Klinikapotheke

- *LABScreen<sup>®</sup> Mixed und LABScreen<sup>®</sup> HLA Klasse I und Klasse II Single*

Eppendorf Gefäße

Probenständer

Pipetten

Papiertücher

Mikrotiterplatten (unbeschichtet)	
goat anti-human IgG-PE	
Luminex 100 IS-System.....	Luminex®
Plattenzentrifuge.....	Universal 320R, Hettich
Plattenvortexer.....	Thermomixer comfort, Eppendorf
Vortexer.....	VELP scientifica
LSM12.....	BMT
LS1A04.....	BMT
LS2A01.....	BMT
LSPWABU7.....	Waschpuffer
Aqua dest.....	Braun/Melsung
PBS.....	Klinikapotheke

### 3.4 Software

Microsoft Word 2003

SPSS 17.0

GTI WinQuid

Microsoft Excel

Endnote 6

Luminex 100 IS 2.3

### 3.5 AB0-Blutgruppen- und Rh-Formelbestimmung

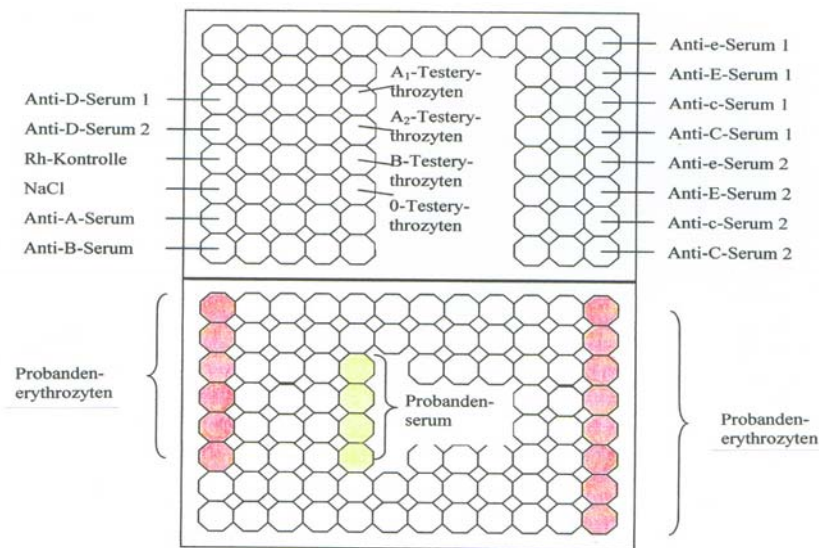
Zur Bestimmung der Blutgruppe wurden zum einen die Probandenerythrozyten auf ihre AB0- und Rh-Oberflächenantigene, zum anderen die Probandenserum auf entsprechende Isoagglutinine untersucht.

Für die AB0-Bestimmung wurden Probandenerythrozyten jeweils mit einem monoklonalen Anti-A und Anti-B Serum sowie mit NaCl (zur Kontrolle) versetzt. Zur Agglutination mit Anti-A Serum kam es, wenn die Erythrozyten das Oberflächenantigen A exprimierten. Agglutinieren sie mit Anti-B Serum, so waren sie Träger des Antigens B. Zeigten sich Agglutinationen mit beiden Testseren, lagen Antigen A und B gleichzeitig auf der Erythrozytenoberfläche vor. Bei fehlender Agglutination sowohl mit Antiserum A, als auch mit Antiserum B befanden, sich auf den Erythrozyten weder A- noch B-Antigene. Bei der Kontrollreaktion mit NaCl durfte keine Agglutination auftreten.

Nach demselben Prinzip wurden die Probandenerythrozyten auf das Vorliegen der Rhesusantigene D, C, c, E und e untersucht. Man versetzte die Erythrozyten mit

monoklonalem Anti-D, Anti-C, Anti-c, Anti-E sowie Anti-e Serum. Der Test wurde parallel mit zwei Antiseren verschiedener Klone durchgeführt. Kam es zur Agglutination, lag das entsprechende Rhesusantigen auf den Erythrozyten vor (die Agglutinationsmuster beider Klone mussten sich dabei gleichen). Ein Rhesuskontrollserum wurde mitgeführt.

Zur Überprüfung der Isoagglutinine, auch Serumgegenprobe genannt, wurden Testerythrozyten mit bekanntem Oberflächenmuster genutzt. Sie trugen entweder das Antigen B, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> oder keines dieser drei genannten (0-Erythrozyten) und wurden mit Probandenserum versetzt. Kam es unter dem Einsatz von B-Testerythrozyten zur Agglutination, zeigte dies das Vorliegen von Anti-B Antikörpern im Probandenserum an. Agglutinierten A-Testerythrozyten mit dem Serum, so lagen Anti-A Antikörper vor. Bei Agglutinationen mit beiden Testzellen existierten Antikörper gegen A- und B-Antigene im Serum. Eine ausbleibende Agglutination zeigte das Fehlen von Antikörpern gegen entsprechende Antigene an. Die 0-Erythrozyten dienten zur Kontrolle (keine Agglutination). Nach der Landsteiner Regel, welche besagt, dass im Serum eines Menschen nur die Isoagglutinine vorkommen, deren Antigene nicht auf den eigenen Erythrozyten exprimiert werden (Landsteiner 1901), konnte aus den Agglutinationsmustern die AB0-Blutgruppe erschlossen werden. Durchgeführt wurden die beschriebenen Reaktionen auf Mikrotiterplatten, welche nach dem in Abbildung 2 gezeigtem Pipettierschema (jeweils ein Tropfen Lösung pro Feld) belegt wurden. Anschließend klappte man diese so zusammen, dass jeweils Patientenserum mit Testerythrozyten bzw. kommerzielles Serum mit Patientenerythrozyten reagieren konnte. Die Probandenerythrozyten wurden vor dem Auftragen mit NaCl zu einer drei- bis fünfprozentigen Suspension verdünnt.



**Abbildung 2: Pipettierschema AB0- und Rh-Formelbestimmung**

Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgten die Beurteilung und die Dokumentation der Agglutinationen über einer Lichtplatte, wobei durch leichtes seitliches Beklopfen der Platte die Reaktionsergebnisse noch deutlicher dargestellt werden konnten.

Bei uneindeutigen Ergebnissen auf der Mikrotiterplatte wurde die Serumgegenprobe im Reagenzglas wiederholt. Dazu wurden jeweils zwei Tropfen Probandenserum in vier Reagenzgläser gegeben. Anschließend fügte man je einen Tropfen der Testerythrozytenlösung (pro Reagenzglas nur eine Sorte Testerythrozyten mit B-, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>- oder 0-Antigenen) hinzu und zentrifugierte jedes Reagenzglas eine Minute bei 1000g. Die Ablesung erfolgt ebenfalls über der Lichtplatte.

### 3.6 Bestimmung erythrozytärer Antikörper

#### 3.6.1 Erythrozyten-Antikörper Suchtest

Grundlage des Erythrozyten-Antikörper Suchtests ist der indirekte Coombstest. Testerythrozyten mit bekannten Oberflächenantigenen werden mit Patientenserum versetzt. Liegen im Serum Antikörper gegen diese Antigene vor, kommt es zur

Antigen-Antikörper-Reaktion. Hinzugegebene Antihumanglobulin-Antikörper binden an die erythrozytären Antikörper und vernetzen diese. Es kommt zur sichtbaren Agglutination.

In der aktuellen Studie wurde der Suchtest auf zwei verschiedenen, kommerziell hergestellten, Gelkarten der Firma DiaMed durchgeführt: auf der „Liss/Coombs“-Karte, welche polyspezifisches Antihumanglobulinserum (Kaninchen-Anti-IgG und monoklonales C3d) enthält und auf der Karte „NaCl/Enzymtest/Kälteagglutinine“. Letztere ermöglicht den Nachweis von Antikörpern, die bei 4°C bzw. 18-25°C reagieren, und ist zudem besser zum Nachweis von Antikörpern des Rh-, Kell- und Kidd-Systems geeignet.

Zur Vorbereitung des Tests wurde ein Tropfen Probandenerythrozytenlösung mit Diluent 2 suspendiert (= Eigenkontrollansatz). Anschließend wurden jeweils 50µl des Testzellpanels (insgesamt drei verschiedene Panels) bzw. des Eigenkontrollansatzes in die Kartenvertiefungen pipettiert – sowohl in die, der „Liss/Coombs“-Karte, als auch in die, der „NaCl/Enzymtest/Kälteagglutinin“-Karte. Es folgte die Zugabe von 25µl Probandenserum pro Kartenvertiefungen. Auf die „NaCl/Enzymtest/Kälteagglutinin“-Karte wurden zusätzlich 25µl Bromelin pipettiert. Beide Karten wurden anschließend 15min bei 37°C inkubiert. Die „Liss/Coombs“-Karte wurde noch weitere 15min bei 25°C im Inkubator belassen. Die „NaCl/Enzymtest/Kälteagglutinin“-Karte wurde 10min bei 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit der „Liss/Coombs“-Karte erfolgte deren Zentrifugation in gleicher Weise. Über der Lichtplatte wurden eventuelle Agglutinationen abgelesen.

### **3.6.2 Erythrozyten-Antikörper Differenzierung**

Zeigten sich im Antikörper Suchtest Agglutinationen, wurde die Differenzierung der Antikörper angeschlossen. Das Prinzip dieser Untersuchung gleicht dem des Antikörper Suchtests. Statt der drei verschiedenen Testerythrozytenlösungen wurden jetzt jedoch 11 eingesetzt. Mit Hilfe der vom Hersteller mitgelieferten Antigentabelle konnten die vorliegenden Antikörperspezifitäten aus dem Agglutinationsmuster ermitteln werden.

### **3.6.3 Titerbestimmung erythrozytärer Antikörper**

Auch die Titerbestimmung wurde auf den bereits beschriebenen Gelkarten durchgeführt (pro Verdünnungsstufe eine Kartenvertiefung).

Zur Testvorbereitung wurde eine bestimmte Anzahl von Reagenzgläsern (je nach gewünschtem Verdünnungsgrad) mit jeweils 200µl NaCl bestückt. In das erste Reagenzglas pipettierte man zusätzlich 200µl Probandenserum. Anschließend wurden daraus 200µl entnommen und in das nächste Röhrchen überführt. Auch von diesem wurden wieder 200µl ab pipettiert und in das folgende Röhrchen gegeben. Dieser Vorgang wurde bis zum Ende der Verdünnungsreihe fortgeführt.

Danach erfolgte die Bestückung der Gelkarten mit 50µl einer, das entsprechende Antigen enthaltenden, Testerythrozytenlösung sowie mit 25µl der jeweiligen Serumverdünnung. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37°C und darauffolgender Zentrifugation (10min, 1000upm) wurde das Ergebnis über der Lichtplatte abgelesen. Die höchste Verdünnungsstufe, bei der noch eine Agglutination nachweisbar war, entsprach dem Antikörpertiter.

## **3.7 Bestimmung von HLA-Antikörpern**

### **3.7.1 HLA-Antikörper Suchtests: LCT, QUIKSCREEN<sup>®</sup>, B-SCREEN<sup>®</sup>**

Für die Suche nach HLA-Antikörpern im Nativblut wurden drei verschiedene Tests herangezogen: lymphozytotoxischer Test (LCT), QUIKSCREEN<sup>®</sup> und B-SCREEN<sup>®</sup>. Die beiden letztgenannten beruhen auf der ELISA-Methode, der LCT ist zellulär basiert.

Das Prinzip des LCTs besteht darin, dass Lymphozyten mit bekanntem HLA-Profil durch eventuell vorhandene, korrespondierende HLA-Antikörper (IgG und IgM) im Serum des Patienten in Gegenwart von Komplement (der LCT ist ein komplementabhängiger Test) lysiert werden. Durch Zusatz eines Fluoreszenzfarbstoffgemisches (FluoroQuench<sup>TM</sup>; enthält Ethidiumbromid zur Anfärbung der zerstörten und Acridinorange zur Anfärbung der vitalen Zellen) wird das Reaktionsergebnis unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht.

Der LCT wurde auf Mikrotiterplatten (6x12 Loch) durchgeführt, welche mit Lymphozyten (HLA-Oberflächenmuster bekannt) beschichtet waren und bis zum Gebrauch bei -70°C lagerten. Nach maximal dreiminütigem Auftauen wurden 2,5µl eines 37°C warmen Zellwaschpuffers (entspricht 5l Aqua dest versetzt mit 47,8g Zellzuchtpuffer) mit einem sechsfach Mikroliterspritzenkamm auf die gesamte Platte aufgetragen. Es folgte eine zehnminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Danach wurde der Zellwaschpuffer auf saugfähigem Papier ausgeklopft. Anschließend wurden 2µl des Probandenserums auf die Platte aufgetropft, wobei die Reihen 11 (Kontrollen) und 12 (Leerwerte) ausgespart blieben. Nach 35min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 2,5µl Komplement pro Vertiefung (Reihen 1-11), welches nun 60min bei Raumtemperatur inkubieren musste. Danach wurden, außer auf Reihe 12, 3µl FluoroQuench<sup>TM</sup> mit Hilfe einer Multimikropipette aufgetragen. Die sich nun anschließende zehnminütige Inkubation erfolgte im Kühlschrank bei 4°C, da das im FluoroQuench<sup>TM</sup> enthaltene Acridinorange licht- und wärmeempfindlich ist.

Zur Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde für jede Vertiefung der Mikrotiterplatte der Anteil der zerstörten und somit rot erscheinenden Lymphozyten angegeben und, wie nachfolgend aufgezeigt, einem Score zugeordnet:

**unter 10 % rote Zellen = Score 1**

**11-20 % rote Zellen = Score 2**

**21-40 % rote Zellen = Score 4**

**60-70 % rote Zellen = Score 6**

**80-100 % rote Zellen = Score 8**

**Nicht lysierte Zellen stellen sich grün dar.**

Score 1 und 2 entspricht einem negativen Testergebnis, Score 4 bis 8 signalisiert das Vorliegen von HLA-Antikörpern im getesteten Serum.

QUIKSCREEN<sup>®</sup> und B-SCREEN<sup>®</sup> gleichen sich in ihrer Durchführung, lediglich die Mikrotiterplatten sind mit unterschiedlichen Glykoproteinen beschichtet: Im Fall des QUIKSCREEN<sup>®</sup> befinden sich HLA Klasse I Glykoproteine in den Mikrowells, beim B-SCREEN<sup>®</sup> sind an dieser Stelle HLA Klasse II Glykoproteine aufgebracht.

Das Grundprinzip beider Tests ist identisch: Eventuell im Patientenserum vorhandene, spezifische HLA-Antikörper binden an die entsprechenden Antigene in den Vertiefungen. Alle nicht gebundenen Antikörper werden durch fünfmaliges Waschen entfernt. Anschließend pipettiert man mit alkalischer Phosphatase markiertes Antihumanglobulinserum (=Konjugat) auf die Platte, welches an die HLA-Antikörper bindet. Durch erneutes Waschen wird sichergestellt, dass kein ungebundenes Konjugat mehr in den Mikrowells verbleibt. Hinzugegebenes p-Nitrophenylphosphat (=Substrat) wird durch die am Antihumanglobulin-Antikörper heftende Phosphatase enzymatisch umgesetzt, wobei eine Farbreaktion entsteht. Diese wird photometrisch bei 410 und 490 nm gemessen.

In der aktuell durchgeführten Testreihe wurden zur Vorbereitung der Mikrotiterplatten 200µl Waschlösung (GTI K1) in jede Vertiefung gegeben, welche dort fünf Minuten inkubierte. Währenddessen wurden die Proben und Kontrollen (pro Patient bzw. Kontrolle ein Eppendorfgefäß) wie folgt vorbereitet:

<b>Patientenprobe:</b>	100 µl Verdünnungspuffer 100 µl Patientenserum
<b>Negativkontrolle:</b>	100 µl Verdünnungspuffer 100 µl Negativkontrollserum
<b>Positivkontrolle:</b>	100 µl Verdünnungspuffer 100 µl Positivkontrollserum

Nach Abkippen und Ausklopfen der Mikrotiterplatte wurden 50µl aus dem jeweiligen Ansatz auf die Platte aufgetragen, wobei Patientenprobe, Negativkontrolle und Positivkontrolle jeweils doppelt bestimmt wurden. Zwei Mikrowells blieben leer (Blanks). Mit Folie abgeklebt inkubierten die Platte 40min bei 37°C. Nach den sich anschließenden fünf Waschgängen erfolgte die Verdünnung des Konjugats 1:100 mit Verdünnungspuffer. Hiervon wurden 50µl in jede Vertiefung, außer in die Blanks, gegeben. Es folgten eine erneute Inkubation für 40min bei 37°C und fünf Waschvorgänge. Danach wurde das Substrat (aufgelöst in 500µl Aqua dest) im Verhältnis 1:100 mit einem entsprechenden Substratpuffer verdünnt. Hiervon wurden 100µl in jedes Mikrowell (Blanks ausgenommen) pipettiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln erfolgte die Messung im Photometer. Als



positives Ergebnis wurden dabei alle Extinktionen gewertet, die größer oder gleich der doppelten Extinktion der Negativkontrolle waren.

### **3.7.2 Titerbestimmung von HLA-Antikörpern**

Um den Titer eines HLA-Antikörpers zu bestimmen, erfolgte zunächst die Anlage einer Verdünnungsreihe (wie unter 3.6.3 bereits beschrieben; jetzt jedoch mit jeweils 500µl NaCl, Patientenserum bzw. Serumverdünnung an Stelle der dort genannten 200µl). Mit den hergestellten Serumverdünnungen wurde anschließend ein QUIKSCREEN® (bei HLA Klasse I Antikörpern) bzw. B-SCREEN® (bei HLA Klasse II Antikörpern) durchgeführt. Auch hier stellte die höchste Verdünnungsstufe, in der ein positives Ergebnis auftrat, den Titer dar.

### **3.7.3 LABScreen® Mixed und LABScreen® HLA Klasse I und II Singles**

LABScreen® Mixed und LABScreen® HLA Klasse I und II Singles basieren auf der Fluorometrie von Durchflusszellen. Beide Tests unterscheiden sich lediglich in den verwendeten Beads: Bei LABScreen® Mixed nutzt man LSM12, bei LABScreen® HLA Klasse I und II Singles gebraucht man LS1A04 zur Differenzierung von HLA Klasse I Antikörpern und LS2A01 zur Differenzierung von HLA Klasse II Antikörpern.

Bei dieser Untersuchung wurde jeder Probandin ein Mikrowell der Mikrotiterplatte zugeordnet. Zusätzlich wurden Negativ- und Positivkontrollen mitgeführt. 5µl der zuvor gevortexten Beadlösung wurden in jede Vertiefung gegeben. Anschließend wurden 20µl Serum hinzu pipettiert und die Platte mit PCR-Folie abklebt. Nach einminütiger Zentrifugation bei 3700upm wurde die Mikrotiterplatte 1min bei 1300upm gevortext, ehe (im Dunkeln) eine Inkubationszeit von 30min begann. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 150µl Waschpuffer (zehnfach LSPWABUF mit dest. Wasser auf eine einfach Lösung verdünnt) pro Well und eine fünfminütige Zentrifugation bei 3700upm. Nach Abschütten des Waschpuffers folgten zwei weitere Waschschrte mit jeweils 200µl Waschpuffer sowie anschließender Zentrifugation. Nun wurden 100µl eines zuvor auf 1:100 mit Waschpuffer verdünnten goat anti-human IgG-PE in jede Kavität pipettiert und 30min im Dunkeln belassen. Nach 5min Zentrifugation bei 3700upm wurden zwei erneute Waschschrte durchgeführt: Hierzu

kamen jeweils 200µl Waschpuffer in jede Vertiefung. Anschließend folgten fünfminütige Zentrifugationen bei 3700upm und das Abschütten des Waschpuffers. Nach Zugabe von 80µl PBS pro Well fand mit Hilfe des Luminex 100 IS-Systems die Datenerfassung statt.

### **3.8 Bestimmung thrombozytärer Antikörper**

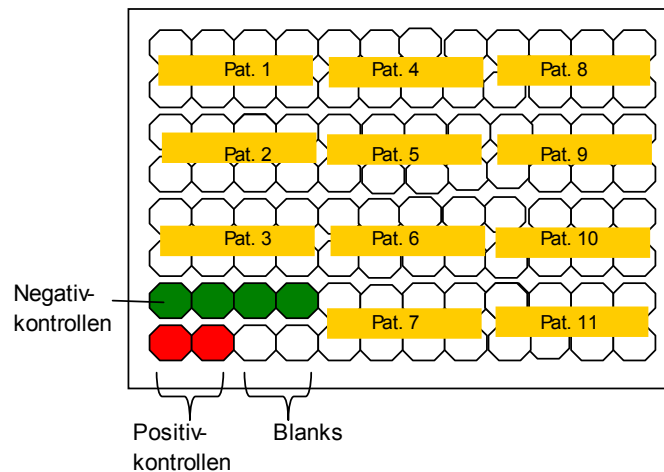
#### **3.8.1 PAK<sup>®</sup>2-LE**

Der PAK<sup>®</sup>2-LE ist ein ebenfalls auf der ELISA-Methode beruhender Suchtest für thrombozytäre Antikörper. Lediglich die Verdünnungen von Proben und Kontrollen sowie das Pipettierschema (Abb. 3) unterscheiden sich von der Durchführung des QUIKSCREEN<sup>®</sup>.

Zu Testbeginn wurden, wie auch bei dem unter 3.7.1 beschriebenen ELISA, 200µl GTI K1 in jede Vertiefung pipettiert. Während der fünfminütigen Inkubationszeit erfolgte die Vorbereitung der Proben- und Kontrollverdünnungen wie folgt:

<b>Patientenprobe:</b>	450 µl Verdünnungspuffer 150 µl Patientenserum
<b>Negativkontrolle:</b>	300 µl Verdünnungspuffer 100 µl Negativkontrollserum
<b>Positivkontrolle:</b>	150 µl Verdünnungspuffer 50 µl Positivkontrollserum

Nach Abschütten der Waschlösung wurden, wie im Pipettierschema (Abb. 3) dargestellt, 50µl dieser Vorverdünnungen pro Well aufgetragen.



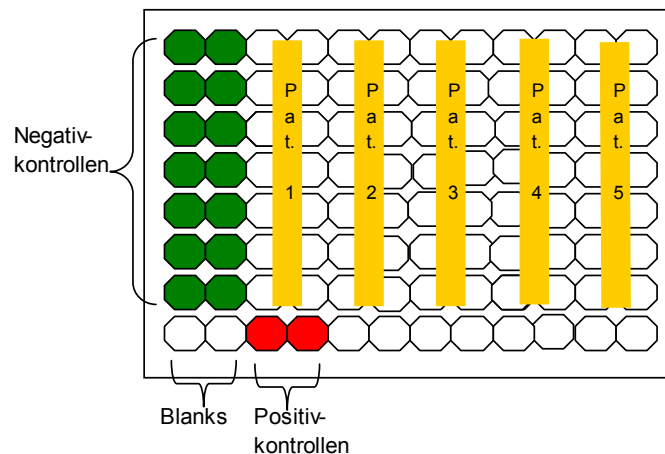
**Abbildung 3: Pipettierschema PAK® 2-LE**

Die sich anschließenden Arbeitsgänge entsprechen den unter 3.7.1 dargestellten Schritten. Mit Hilfe des vom Hersteller mitgelieferten Recording Sheets konnte im Falle eines positiven Ergebnisses ablesen werden, gegen welches Glykoprotein der Plättchenmembran der Antikörper gerichtet ist.

### 3.8.2 PAKPLUS®

Lieferte der PAK® 2-LE ein positives Ergebnis, wurde der PAKPLUS® zur weiteren Differenzierung des Antikörpers angeschlossen. Durchführung und Messung ähneln auch hier dem QUIKSCREEN®. Nach fünfminütiger Inkubation der Waschlösung wurden von folgenden Vorverdünnungen jeweils 50 µl pro Mikrowell nach dem in Abbildung 4 gezeigten Pipettierschema aufgetragen:

<b>Patientenprobe:</b>	600 µl Verdünnungspuffer 200 µl Patientenserum
<b>Negativkontrolle:</b>	600 µl Verdünnungspuffer 200 µl Negativkontrollserum
<b>Positivkontrolle:</b>	150 µl Verdünnungspuffer 50 µl Positivkontrollserum



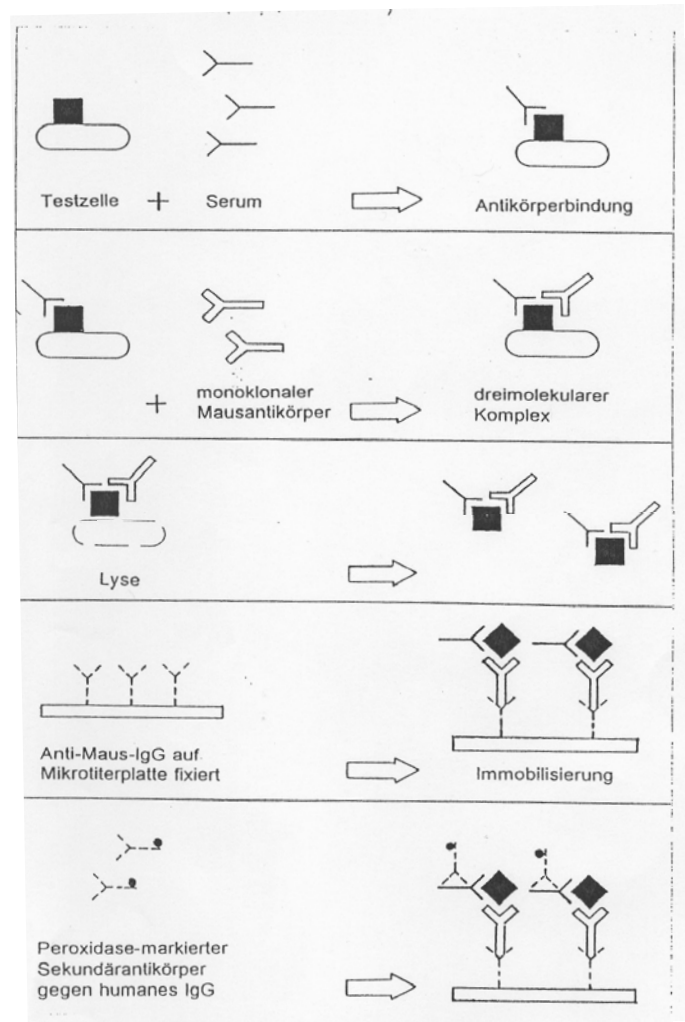
**Abbildung 4: Pipettierschema PAKPLUS®**

Die sich anschließenden Arbeitsgänge entsprechen auch hier den unter 3.7.1 dargestellten Schritten. Der einzige Unterschied besteht darin, dass bei diesem Test zwei verschiedene Konjugate (Antihuman-IgM/A und -IgG) zur Anwendung kommen. Mit Hilfe des Recording Sheets konnte zum einen die Glycoproteinspezifität des Antikörpers, zum anderen dessen Immunglobulinklasse ermittelt werden.

### 3.8.3 Indirekter MAIPA-Assay

Die Abkürzung MAIPA steht für „monoclonal antibody immobilization of platelet antigens“. Dieser Test wurde durchgeführt, wenn sich im PAKPLUS® ein positives Ergebnis zeigte. Mit Hilfe dieses Tests konnte eine genaue Identifizierung des vermuteten HPA-Antikörpers ermöglicht werden. Das Testprinzip ist in Abbildung 5 dargestellt (nach Scharinger 1997). Testzellen mit bekanntem HPA- und HLA-Oberflächenprofil werden mit dem zu untersuchenden Serum inkubiert. Ist in diesem ein kompatibler Antikörper enthalten, bindet sich dieser an das entsprechende Antigen auf der Testzelle. Im nächsten Schritt wird ein monoklonaler Mausantikörper, der mit demselben Glykoprotein wie der vermutete humane Antikörper interagiert, hinzugefügt. So entsteht ein dreimolekularer Komplex aus zwei Antikörpern und einem Antigen auf der Testzelle. Nun wird mit Hilfe eines Solubilisats das Antigen mit den gebundenen Antikörpern von der Testzelloberfläche abgelöst. Dieses Lysat wird auf eine Mikrotiterplatte gegeben, deren Vertiefungen mit Anti-Maus-IgG beschichtet sind. Durch Bindung an den monoklonalen Mausantikörper wird der dreimolekulare

Komplex immobilisiert. Ein hinzugegebener, mit Peroxidase markierter, Antihuman-Antikörper reagiert mit dem humanen Antikörper und macht diesen durch eine enzymatische Farbreaktion sichtbar (nach Mueller-Eckhardt und Kiefel 2004).



**Abbildung 5: Prinzip des MAIPA-Assays (Schäpfer 1997)**

In der aktuell durchgeführten Studie wurden zu Testbeginn jeweils 100µl der in zweiprozentigem PBS-BSA gelösten Testthrombozyten in Eppendorf Gefäße gegeben und zentrifugiert (1min bei 10000U). Nach Absaugen des Überstandes resuspendierte man den Rest in 30µl PBS-BSA (2%ig) und gab 30µl des zu untersuchenden Serums hinzu. Daran schloss sich eine dreißigminütige Inkubation bei 37°C an. Daraufhin wurden 100µl NaCl zu den Proben pipettiert. Nach wiederholter Zentrifugation (1min bei 10000U) wurde der Überstand abgesaugt und der Thrombozytensatz mit 30µl PBS-BSA (2%ig) resuspendiert. Anschließend wurden 10µl eines 1:15 mit PBS-BSA (2%ig) verdünnten, glykoproteinspezifischen

monoklonalen Mausantikörpers dazugetropft und für 30min bei 37°C im Brutschrank belassen. Hierauf folgten drei Waschschriffe (Zugabe von 100µl NaCl, dann Zentrifugation für 1min bei 10000 U und Absaugen des Überstandes), an die sich die Aufschwemmung des Thrombozytensediments in 100µl Solubilisierungspuffer anschloss. Diese Lösung musste über Nacht im Kühlschrank inkubieren. Zur Beschichtung der Mikrotiterplatte wurden 100µl Ziege-Anti-Maus-IgG mit Coatingpuffer im Verhältnis 1:500 gemischt. Hiervon wurden 100µl in jede Vertiefung gegeben, ehe die Platte für vier Stunden in den Kühlschrank kam.

Der nächste Tag begann mit einer dreißigminütigen Zentrifugation der Probengemische bei 14000U und 4°C. Währenddessen wurde die mit Anti-Maus-IgG beschichtete Mikrotiterplatte mit TBS-Waschpuffer im Plattenwaschgerät gewaschen. Anschließend wurde jene abgeklebt und für 20min kühlgestellt. Nach Beendigung der Zentrifugation wurden 50µl des Überstandes abgenommen und mit 200µl TBS-Waschpuffer in neue Eppendorf Gefäße pipettiert. Von dieser Verdünnung wurden 100µl pro Mikrowell aufgetragen, wobei die Bestimmung als Doppelansatz durchgeführt und ein multispezifischer HLA-Antikörper als Positivkontrolle mitgeführt wurde. Leerwerte wurden ebenfalls bestimmt.

Nach neunzigminütiger Inkubation im Kühlschrank wurde die Platte mit 200µl Waschpuffer pro Mikrowell dreimal gewaschen und abschließend trocken geklopft. Daran anknüpfend wurden 100µl Konjugat pro Well aufgetragen und 120min bei 4°C zur Inkubation belassen. Hierauf folgten vier Waschschriffe im Plattenwaschgerät sowie die Zugabe von 100µl Substratverdünnung, welche zuvor durch Auflösen von vier OPD-Tabletten in 12ml Aqua dest und Zugabe von 5µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hergestellt wurde. Es folgte eine 15-minütige Inkubation im Dunkeln. Abschließend wurde die Farbreaktion durch 50µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt. Die Messung erfolgte am ELISA-Reader bei 492nm. Ein positives Ergebnis lag vor, wenn die Differenz aus Readerwert und Leerwert größer als 0,15 war. Mit Hilfe der mitgelieferten Recording Sheets konnte die Spezifität des HPA-Antikörpers ermittelt werden.

### **3.9 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Arbeit erfolgte mit der Software SPSS 17.0. Mit Hilfe dieses Programms wurden die absoluten und relativen Häufigkeiten der untersuchten Antikörper in der Kohorte bestimmt.

Die Prüfung der untersuchten Zusammenhänge auf Signifikanz geschah mittels Chi-Quadrat-Test nach Pearson. Ein Ergebnis galt dabei als signifikant, das heißt nicht durch Zufall bedingt, wenn die ermittelte Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  kleiner oder gleich 0,05 war.

Bei Fragestellungen, bei denen mehrere Einzelvergleiche angestellt werden konnten, wurde durch Alpha-Adjustierung nach Shaffer, modifiziert nach Holm, die Irrtumswahrscheinlichkeit für die Mehrhypothesenproblematik bestimmt. Hiermit ließen sich Aussagen dahingehend treffen, ob, und wenn ja welche, Nullhypothesen gleichzeitig als signifikant anzusehen sind.

Zur Einschätzung der Stärke des Zusammenhangs zwischen den untersuchten Variablen wurde der Kontingenzkoeffizient berechnet, welcher Werte zwischen 0 (kein Zusammenhang) und 1 (starker Zusammenhang) annehmen kann.

Für ausgewählte Ereignisse erfolgte die Bestimmung des relativen Risikos, welches sich aus dem Quotient der Wahrscheinlichkeiten für das Eintreten eines Ereignisses unter Exposition bzw. Nichtexposition gegenüber einer Variablen ergibt. Schließt das für das relative Risiko berechnete 95%-Konfidenzintervall den Wert 1,0 nicht ein, ist das ermittelte relative Risiko als signifikant zu werten.

## 4 Ergebnisse

### ***4.1 Häufigkeit von erythrozytären, thrombozytären und HLA-Alloantikörpern in der Schwangerschaft***

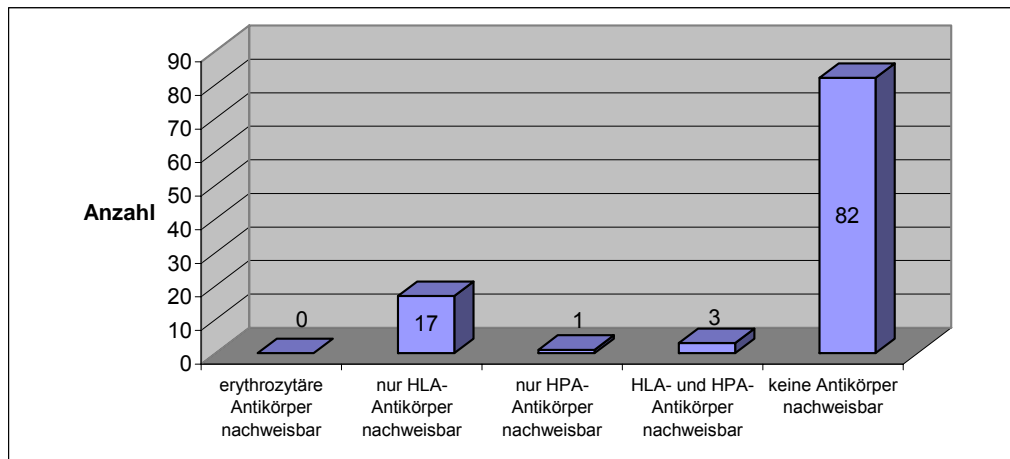
Bei 20,4% (n=21) der untersuchten 103 schwangeren Frauen ließen sich, nach Durchführung der in Kapitel 3 beschriebenen Tests, Antikörper nachweisen (Abb. 6).



Prob.-ID	Quick-Screen	B-Screen	PAK 2LE	LCT-Ges. ohne DTT (PRA+Ak-Spezifität)	HLA-Ak Titer (ELISA)	PAK Plus Maipa	Maipa-Titer	LABScMix Klasse I	LABScMix Klasse II	Single I (Anti-HLA)	Single II (Anti-HLA)	
6A	neg	neg	neg	3% unspez.				pos	neg	B27, B61		
6B	neg	neg	neg	neg								
6C	neg	neg	neg	neg								
9A	neg	pos	neg	neg	1:2 (II)			pos	pos	A29, A30, A11, Cw7, Cw4	DR 51,52	
9B	neg	pos	neg	neg	1:1 (II)							
10A	pos	neg	neg	neg	1:8 (I)							
10B	pos	neg	neg	25% B7, B55, B56	1:32 (I)							
10C	pos	neg	neg	81,7% unspez.	1:1024 (I)							
10D	pos	neg	neg	43%A3, B7, B22	1:1024 (I)			pos	neg	unspez.		
19A	pos	pos	neg	42% A2	1:4 (I); 1:1 (II)							
19B	pos	pos	neg	50% A2, A28	1:512 (I); 1:32 (II)							
19C	pos	pos	neg	50% A2, A28	1:2048 (I), 1:128 (II)			pos	pos	A29, A34, A31, A23, A30, A33, A24, A68, A36, A11 A66, B57, B58, B56, Cw5	unspez.	
23A	pos	neg	neg	neg	1:2 (I)			pos	neg	A23, A24, A25, A32, B13, B57, B63, B59, B38		
23B	pos	neg	neg	neg	1:1 (I)							
23C	pos	neg	neg	neg	1:1 (I)							
34A	pos	neg	neg	47% A19	1:128 (I)			pos	neg	unspez.		
34B	pos	neg	neg	50% A19	1:128 (I)							
38A	neg	neg	neg	neg								
38B	pos	neg	neg	neg	1:16 (I)			pos	neg	A23, A24, A80, A1		
42A	neg	neg	GP1Ib/IIla	neg		GP1Ib/IIla	Anti-HPA 1a					
42B	neg	neg	GP1Ib/IIla	neg				1:4				
42C	neg	neg	GP1Ib/IIla	neg		GP1Ib/IIla	Anti-HPA 1a	1:4				
42D	neg	neg	GP1Ib/IIla	neg				1:1	neg	neg		
43A	neg	neg	neg	neg								
43B	pos	neg	neg	neg	1:64 (I)							
43C	pos	neg	GP1Ia/IIa	48% unspez.	1:32 (I)	GP1Ia/IIa	Anti-HPA 5b	1:1	pos	neg	unspez.	
56A	pos	neg	neg	neg	1:16 (I)			pos	neg	B56, B63, B50, B72, B62, B49, B71, B46		
56B	pos	neg	neg	neg	1:8 (I)							
56C	neg	neg	neg	neg								
60A	pos	neg	neg	neg	1:4 (I)							
60B	pos	neg	neg	neg	1:2 (I)			pos	pos	A1	DR7	
66A	pos	pos	neg	neg	1:4 (I), 1:8 (II)							
66B	pos	pos	neg	neg	1:1 (I), 1:2 (II)			pos	pos	B13, B27, B81	DR7, DR4, DR53	
66C	neg	pos	neg	neg	1:8 (II)							
72A	pos	neg	neg	neg	1:4 (I)							
72B	pos	neg	neg	neg	1:16 (I)			pos	neg	B27, B63, B42, B57, B81, B67, B7, B82, B73, B55, B58		
79A	pos	pos	neg	neg	1:16 (I), 1:4 (II)			pos	pos	A33, B62, B76, B72, B63	DR4	
79B	neg	pos	neg	neg	1:4 (II)							
79C	pos	pos	neg	neg	1:2 (I), 1:16 (II)							
79D	pos	pos	neg	neg	1:4 (I), 1:32 (II)							
84A	neg	neg	neg	95% unspez.								
84B	neg	neg	neg	60% unspez.				pos	neg	A23, A24		
84C	neg	neg	neg	neg								
86A	pos	neg	neg	neg	1:32 (I)							
86B	pos	pos	neg	neg	1:1 (I), 1:2 (II)			pos	pos	B8, B42, A1, A36, A29	DP9, DP17, DP3, DP1, DP5, DP14, DP11, DP19, DQ 2	
86C	pos	pos	neg	neg	1:4 (I), 1:8 (II)							
87A	neg	pos	neg	neg	1:1 (II)							
87B	neg	pos	neg	neg	1:1 (II)							
87C	pos	pos	neg	neg	1:1 (I), 1:1 (II)			pos	pos	B57, B58, Cw12	DR13, DR17, DR11, DQ9	
89A	pos	neg	GP1Ia/IIa	neg	1:1 (I)	GP1Ia/IIa	Anti-HPA 5b	1:64	pos	pos	neg	DR4
93A	pos	pos	neg	neg	1:2 (I), 1:2 (II)							
93B	pos	pos	neg	neg	1:1 (I), 1:1 (II)			pos	neg	B81, B7, B72, B48		
93C	pos	pos	neg	neg	1:2 (I), 1:1 (II)							
95A	pos	neg	neg	neg	1:4 (I)			pos	neg	B27, B81, B42, B67, B7, B82		
95B	neg	neg	neg	neg								
95C	pos	neg	neg	neg	1:1 (I)							
109A	pos	neg	GP1Ia/IIa	neg	1:2 (I)	GP1Ia/IIa	Anti-HPA 5b	1:128				
109B	pos	pos	GP1Ia/IIa	46% A2	1:128 (I), 1:16 (II)			1:128	pos	pos	B49, B44, B47, B59, B57	DR12, DR7, DR9, DR53, DR52, DQ2, DQ9
109C	pos	pos	GP1Ia/IIa	57%A2, A28, B13	1:64 (I), 1:32 (II)			1:128				

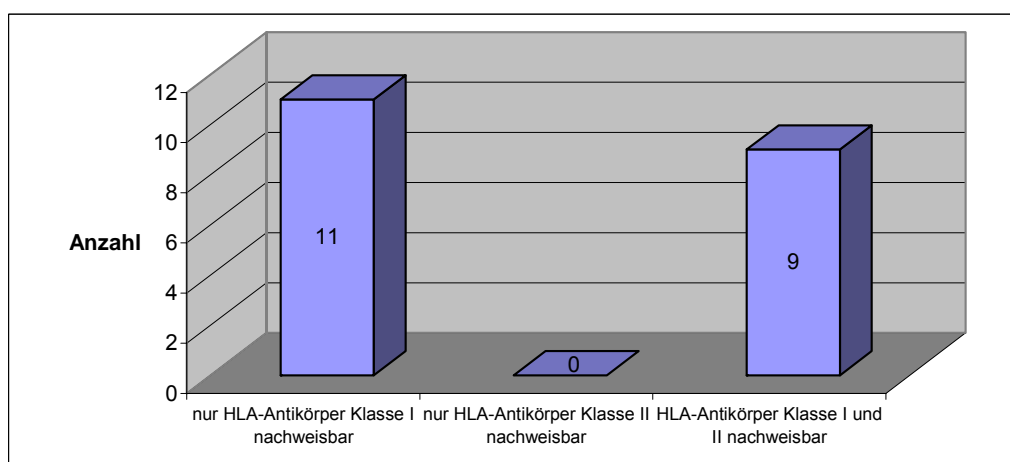
Abbildung 6: Testergebnisse und Titer der 21 Schwangeren mit HLA- bzw. HPA-Antikörpern

Bei keiner der 103 Probandinnen wurden erythrozytäre Antikörper nachgewiesen. Abbildung 7 gibt eine Übersicht über die absoluten Häufigkeiten der untersuchten Antikörper in der Kohorte.



**Abbildung 7: absolute Häufigkeit der untersuchten Antikörper in der Kohorte**

Die auf der Luminextechnologie basierenden Bestätigungstests für das Vorliegen von HLA-Antikörpern lieferten in 19,4% (n=20) der untersuchten Fälle ein positives Ergebnis. Die Differenzierung in Antikörper gegen HLA Klasse I und Klasse II zeigte, dass von allen HLA-Antikörper positiven Frauen Antikörper gegen Klasse I Antigene ausgebildet wurden. Bei neun Frauen konnten zusätzlich Antikörper gegen HLA Klasse II gefunden werden. Eine alleinige Bildung von HLA Klasse II Antikörpern trat nicht auf (Abb. 8).



**Abbildung 8: Häufigkeit der Antikörper gegen HLA Klasse I und II**

35,0% (n=7) der Frauen, bei denen mit Hilfe der Luminex-Technik HLA-Antikörper der Klasse I gefunden wurden, zeigten gleichzeitig positive Reaktionen im LCT, wobei in 42,9% (n=3) keine Differenzierung daraus ableitbar war. In vier Fällen (57,1%) gelang eine Antikörperdifferenzierung. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt.

In 3,9% (n=4) der Fälle wurden mit Hilfe des indirekten MAIPA-Assays gegen Thrombozytenantigene gerichtete Antikörper nachgewiesen, wobei eine Probandin Anti-HPA 1a, die weiteren drei Anti-HPA 5b bildeten.

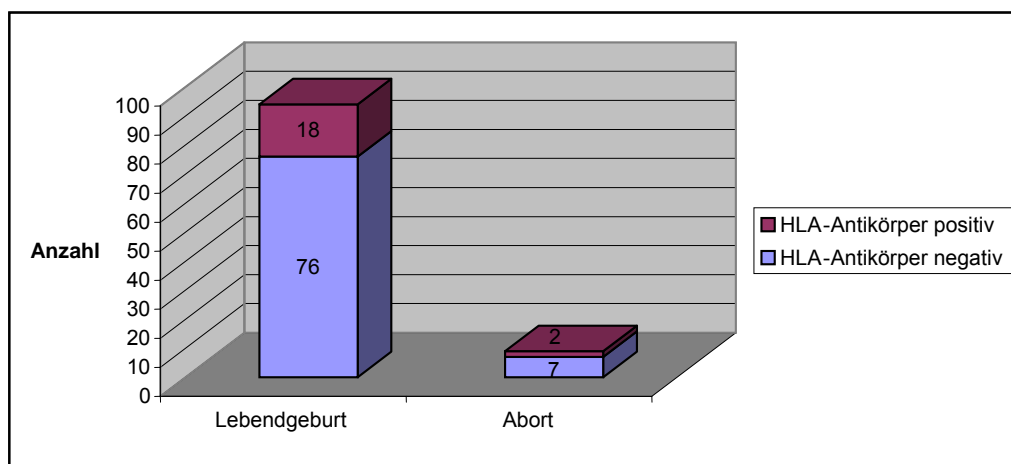
Bei einer der Anti-HPA positiven Frauen trat nur dieser Antikörper auf, bei den anderen 75,0% (n=3) fanden sich zusätzlich HLA-Antikörper. Umgekehrt lagen in der Gruppe aller Probandinnen mit positivem HLA-Antikörperbestätigungstest (n=20) in 15,0% (n=3) zusätzlich HPA-Antikörper vor. Bezogen auf alle untersuchten 103 Schwangeren wurden in 2,9% (n=3) HLA- und HPA-Antikörper nachgewiesen. Im Chi-Quadrat-Test nach Pearson ergibt sich mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha=0.022$  ein signifikanter Zusammenhang für das gemeinsame Auftreten dieser beiden Antikörpergruppen. Der Kontingenzkoeffizient  $C=0,272$  bewertet die untersuchte Beziehung als schwach. Das relative Risiko für die Ausbildung thrombozytärer Antikörper ist bei vorliegenden HLA-Antikörpern signifikant 12,50-mal höher, als bei Frauen ohne HLA-Antikörper (95%-Konfidenzintervall von 1,39 bis 111,11). Das relative Risiko einer Frau HLA-Antikörper zu bilden, ist 4,37-mal höher, wenn thrombozytäre Antikörper nachgewiesen wurden.

## **4.2 Beeinflussung des Schwangerschaftsverlaufs durch Alloantikörper**

91,3% (n=94) der Frauen beendeten die beobachtete Schwangerschaft mit einer Lebendgeburt, bei den übrigen 8,7% (n=9) kam es zum Abort. In der Geburtshilfe verwendet man den Begriff Abort für Fehlgeburten bis zur 24. SSW. Nach der 24. SSW wird von Früh- bzw. Totgeburt gesprochen (Bühling 2004). Um die statistische Auswertung zu vereinfachen, wird im Folgenden unter „Abort“ jede Fehl- oder Totgeburt verstanden, unabhängig von der Schwangerschaftswoche. Auf den Abortzeitpunkt wird im Kapitel Diskussion explizit eingegangen.

#### 4.2.1 Beeinflussung des Schwangerschaftsverlaufs durch HLA-Antikörper

Unter den 94 Frauen mit Lebendgeburt ließen sich in 19,1% (n=18) Antikörper gegen HLA nachweisen, in der Abortgruppe hingegen bei 22,2% (n=2) (Abb. 9).

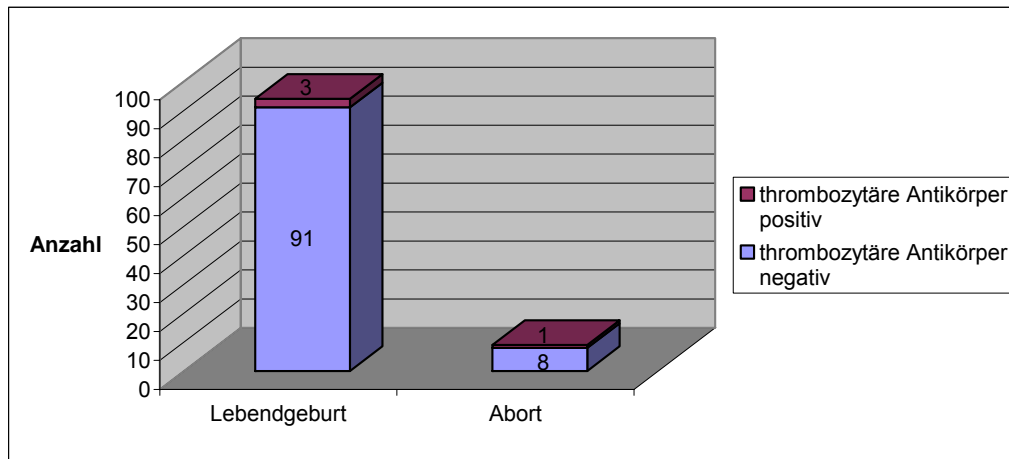


**Abbildung 9: Beeinflussung des Schwangerschaftsverlaufs bzgl. Abort/Lebendgeburt durch HLA-Antikörper im mütterlichen Serum**

Im Chi-Quadrat-Test ergibt sich für diesen Zusammenhang eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha=1,000$ . Somit liegt keine signifikante Beeinflussung des Schwangerschaftsverlaufs durch Antikörper gegen HLA vor. Der Kontingenzkoeffizient beträgt  $C=0,022$ .

#### 4.2.2 Beeinflussung des Schwangerschaftsverlaufs durch thrombozytäre Antikörper

Mit Hilfe des indirekten MAIPA Assays wurden bei 3,2% (n=3) der Probandinnen, welche die beobachtete Schwangerschaft mit einer Lebendgeburt beendeten, Antikörper gegen humane Plättchenantigene nachgewiesen. Von den neun Frauen, die einen Abort erlitten, zeigte eine Probandin thrombozytäre Antikörper. Dies entspricht einer relativen Häufigkeit von 11,1%. 88,9% (n=8) der Frauen mit Abort waren HPA-Antikörper negativ (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Beeinflussung des Schwangerschaftsverlaufs bzgl. Abort/Lebendgeburt durch HPA-Antikörper im mütterlichen Serum**

Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  für den dargestellten Zusammenhang beträgt  $\alpha=0,310$  und überschreitet somit das Signifikanzniveau  $\alpha=0,050$  deutlich. Der ermittelte Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von thrombozytären Antikörpern und dem Verlauf der beobachteten Schwangerschaft muss daher als nicht signifikant angenommen werden. Der Kontingenzkoeffizient beträgt  $C=0,115$ .

#### **4.2.3 Beeinflussung des Schwangerschaftsverlaufs durch gleichzeitiges Vorliegen von Thrombozyten- und HLA-Antikörpern**

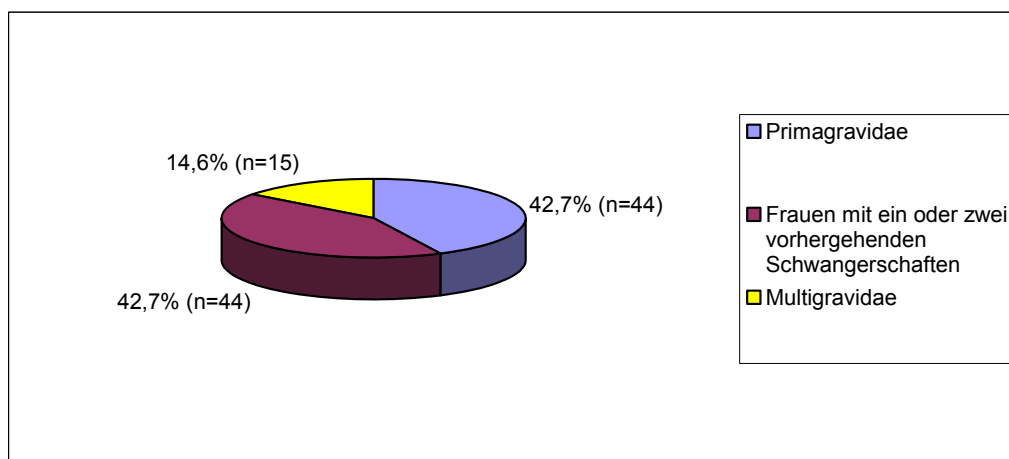
Zwei der insgesamt drei Schwangeren, in deren Serum gleichzeitig HLA- und HPA-Antikörper auftraten, zeigten einen unauffälligen Verlauf der Schwangerschaft. Im Fall von Probandin #43 konnten durch den indirekten MAIPA Anti-HPA 5b Antikörper (SSW 31) nachgewiesen werden. Sowohl QUIKSCREEN®, LCT (PRA 48%) und LABScreen® Mixed reagierten positiv (mit einem maximalen Titer von 1:64 im QUIKSCREEN®). In der Differenzierung ergaben sich unspezifische Befunde. Bei #109 handelte es sich ebenfalls um Anti-HPA 5b Antikörper. Der LCT ergab in SSW 25 eine PRA von 46% für Anti-HLA A2. In SSW 33 zeigte der LCT zusätzlich Anti-HLA A28 und B13 (PRA 57%). Mit Hilfe der Luminex-Technologie wurden zudem Antikörper gegen HLA B49, B44, B47, B59, DR12, DR7, DR9, DR53, DR52, DQ2 und DQ9 gefunden.

Bei der dritten Frau dieser Gruppe (#89) trat ein Abort auf. In diesem Fall wurde in SSW 7 ein Anti-HPA 5b Antikörper (Titer 1:64) nachgewiesen. Außerdem zeigten sich im LABScreen® HLA Klasse II Single Anti-HLA DR4 Antikörper.

Aufgrund der niedrigen Fallzahlen für das Ereignis „gleichzeitiges Vorliegen von HLA- und HPA-Antikörpern“ wurde auf die Durchführung von Signifikanztests an dieser Stelle verzichtet.

### **4.3 Häufigkeit von Thrombozyten- und HLA-Alloantikörpern in Abhängigkeit von der Zahl vorhergehender Schwangerschaften**

Die Gruppe der Primagravidae, das heißt der Frauen mit keiner Vorschwangerschaft in der Anamnese, umfasste 42,7% (n=44) der untersuchten Kohorte. Ebenfalls 44 Probandinnen (42,7%) waren bereits zu einem früheren Zeitpunkt ein oder zwei Mal schwanger. Der Anteil der Multigravidae (Frauen mit drei oder mehr vorhergehenden Schwangerschaften) betrug 14,6% (n=15) (Abbildung 11).



**Abbildung 11: vorhergehende Schwangerschaften in der untersuchten Kohorte**

#### **4.3.1 HLA-Antikörper in Abhängigkeit von der Zahl vorhergehender Schwangerschaften**

Beim Vergleich der Gruppe der Primagravidae mit der Gruppe der Frauen, die mindestens eine Vorschwangerschaft aufwiesen, fanden sich bei 97,7% (n=43) der

Primagravidae keine Antikörper, wohingegen 32,2% (n=19) der Frauen mit mindestens einer Schwangerschaft in der Anamnese HLA-Antikörper zeigten. Das im Chi-Quadrat-Test ermittelte  $\alpha$ -Niveau von  $\alpha=0,000$  belegt, dass die Unterschiede bzgl. der Häufigkeit von HLA-Antikörpern in den beschriebenen Gruppen (2,3% (n=1) in der Gruppe der Primagravidae bzw. 32,2% (n=19) in der Gruppe der Frauen mit mindestens einer früheren Schwangerschaft) als signifikant anzusehen sind. Der Kontingenzkoeffizient beträgt  $C=0,351$ . Das relative Risiko für die Ausbildung von HLA-Antikörpern ist für Frauen mit mindestens einer vorhergehenden Schwangerschaft 14,17-mal höher, als für Frauen ohne frühere Schwangerschaft. Dieser Unterschied ist ebenfalls als signifikant zu werten, da das 95%-Konfidenzintervall (untere Grenze 1,971, obere Grenze 101,871) den Wert 1 nicht einschließt.

Der Vergleich von Probandinnen mit weniger als drei Vor-Schwangerschaften mit den Frauen, die bereits mindestens drei Mal schwanger waren, ergab mit einem  $\alpha$ -Niveau von  $\alpha=0,001$  ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang. 53,3% (n=8) der Multigravidae zeigten HLA-Antikörper, wohingegen nur 13,6% (n=12) der Frauen, die weniger als drei frühere Schwangerschaften hatten, im HLA-Antikörpertest ein positives Ergebnis aufwiesen. Der Kontingenzkoeffizient für diesen Vergleich beträgt 0,334. Für Multigravidae ergibt sich ein 3,91-mal höheres, relatives Risiko HLA-Antikörper zu bilden, als für Frauen mit weniger als drei Vor-Schwangerschaften. Dieses relative Risiko ist bei einem 95%-Konfidenzintervall zwischen 1,93 und 7,94 ebenfalls signifikant.

Das  $\alpha$ -Niveau für den Vergleich der Gruppen Primagravidae und Multigravidae hinsichtlich der Häufigkeit von HLA-Antikörpern beläuft sich auf  $\alpha=0,000$ . Somit sind die in Tabelle 2 dargestellten Unterschiede bzgl. der Auftretenswahrscheinlichkeit von HLA-Antikörpern in den beiden Gruppen als signifikant anzusehen. Der Kontingenzkoeffizient beträgt  $C=0,526$ .

**Tabelle 2: Häufigkeit von HLA-Antikörpern in den Gruppen der Prima- und Multigravidae**

		HLA-Antikörper		Gesamt
		negativ	positiv	
Primagra- vidae	Anzahl	43	1	44
		97,7%	2,3%	100,0%
Multigravidae	Anzahl	7	8	15
		46,7%	53,3%	100,0%
Gesamt	Anzahl	50	9	59
		84,7%	15,3%	100,0%

Primagravidae haben gegenüber Multigravidae ein 23,47-mal niedrigeres, relatives Risiko HLA-Antikörper auszubilden. Für das 95%-Konfidenzintervall ergibt sich eine untere Grenze von 3,19 und eine obere Grenze von 166,67, womit dieser Unterschied als signifikant anzusehen ist.

Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha=0,003$  ebenfalls nicht zufallsbedingt ist die Tatsache, dass in der Gruppe der Probandinnen mit ein oder zwei Vor-Schwangerschaften bei 25,0% ( $n=11$ ) der Frauen HLA-Antikörper auftraten, bei den Primagravidae hingegen nur bei 2,3% ( $n=1$ ). Der Kontingenzkoeffizient beträgt 0,314. Für Frauen mit ein oder zwei früheren Schwangerschaften ergibt sich ein 11,00-mal höheres, signifikantes (95%-Konfidenzintervall zwischen 1,48 und 83,33) relatives Risiko Antikörper gegen HLA auszubilden, als für Primagravidae.

Vergleicht man die eben besprochene Gruppe der Probandinnen mit ein oder zwei Schwangerschaften in der Anamnese mit der Gruppe der Multigravidae, so hat letztere ein 2,13-mal höheres, signifikantes (95%-Konfidenzintervall zwischen 1,06 und 4,29) relatives Risiko HLA-Antikörper zu entwickeln. Die in Tabelle 3 gezeigten unterschiedlichen Auftretenswahrscheinlichkeiten für HLA-Antikörper in den beiden Gruppen müssen jedoch als nicht signifikant angenommen werden, da das  $\alpha$ -Niveau im Chi-Quadrat-Test mit  $\alpha=0,058$  über 0,050 liegt.



**Tabelle 3: Häufigkeit von HLA-Antikörpern in der Gruppe der Frauen mit ein oder zwei früheren Schwangerschaften sowie in der Gruppe der Multigravidae**

		HLA-Antikörper		Gesamt
		negativ	positiv	
Frauen mit ein oder zwei vorherg. Schwangerschaften	Anzahl	33 75,0%	11 25,0%	44 100,0%
Multigravidae	Anzahl	7 46,7%	8 53,3%	15 100,0%
Gesamt	Anzahl	50 84,7%	9 15,3%	59 100,0%

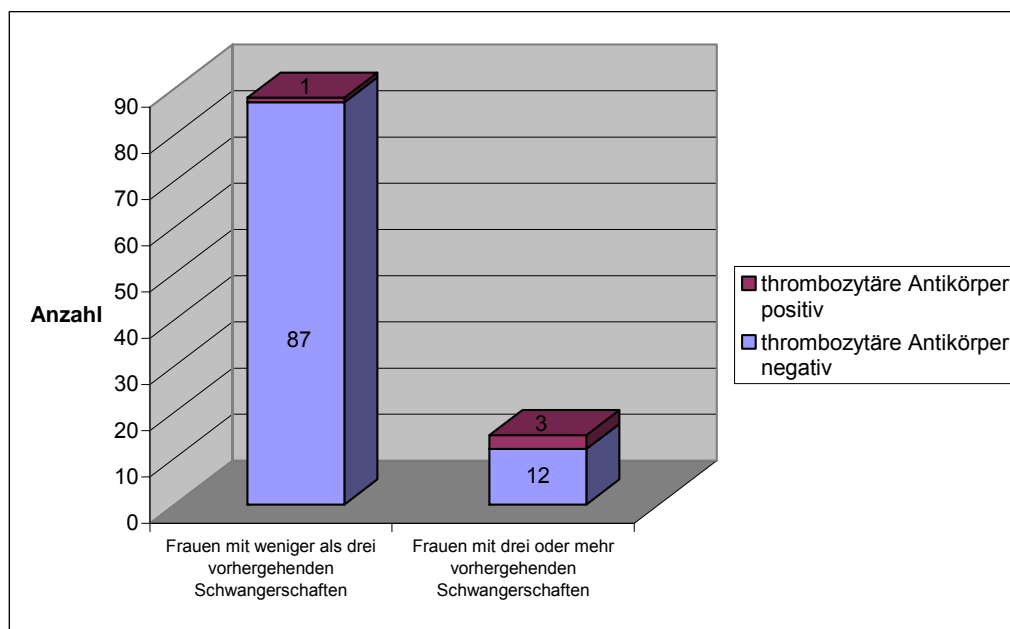
Mit dem Verfahren der Alpha-Adjustierung nach Shaffer, modifiziert nach Holm, ist eine komplexe Beurteilung der oben aufgeführten Einzelvergleiche der drei Gruppen – Primagravidae, Multigravidae und Frauen mit ein oder zwei früheren Schwangerschaften – möglich. Dieser Mehrhypothesentest erlaubt die Aussage, dass Primagravidae signifikant seltener HLA-Antikörper aufweisen, als Frauen mit vorhergehenden Schwangerschaften.

#### **4.3.2 thrombozytäre Antikörper in Abhängigkeit von der Zahl vorhergehender Schwangerschaften**

Bei Gegenüberstellung der Gruppen Primagravidae und „Frauen mit mindestens einer Vor-Schwangerschaft“ wurde deutlich, dass bei keiner Primagravidae thrombozytäre Antikörper auftraten. Alle vier Probandinnen, bei denen HPA-Antikörper nachweisbar waren, hatten mindestens eine frühere Gravidität. Im Chi-Quadrat-Test erweist sich dieser Zusammenhang als nicht signifikant. Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt bei  $\alpha=0,134$  und damit deutlich über dem Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$ .

Werden die Frauen mit weniger als drei Vor-Schwangerschaften mit den Frauen verglichen, die bereits drei Mal oder häufiger schwanger waren, zeigt sich, dass 98,9% (n=87) der Probandinnen mit weniger als drei Vor-Schwangerschaften keine HPA-Antikörper ausbildeten (Abb. 12). Hingegen fiel bei 20% (n=3) der Frauen mit

mindestens drei früheren Graviditäten der indirekte MAIPA-Assay positiv aus. Abbildung 12 veranschaulicht diesen signifikanten Zusammenhang, für den sich im Chi-Quadrat-Test eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha=0,009$  ergibt. Der errechnete Kontingenzkoeffizient liegt bei  $C=0,326$ . Das relative Risiko für das Auftreten thrombozytärer Antikörper ist bei Frauen mit drei oder mehr vorhergehenden Schwangerschaften 17,60-mal höher, als bei Frauen mit weniger als drei Graviditäten in der Anamnese. Das 95%-Konfidenzintervall umfasst den Bereich von 1,96 bis 166,67. Somit ist das unterschiedliche relative Risiko für das Auftreten von HPA-Antikörpern in den beiden genannten Gruppen signifikant.



**Abbildung 12: Häufigkeit von HPA-Antikörpern in den Gruppen "weniger als drei frühere Schwangerschaften" und "mindestens drei frühere Schwangerschaften"**

Nicht zufällig ist mit einem  $\alpha$ -Niveau von  $\alpha=0,014$  auch die unterschiedliche Auftretenswahrscheinlichkeit thrombozytärer Antikörper bei Multi- und Primigravidae: 20% ( $n=3$ ) der Multigravidae zeigten die besagten Antikörper, jedoch keine (0,0%) der Primigravidae. Der Kontingenzkoeffizient hierfür beträgt  $C=0,369$ .

Bei Betrachtung der Gruppen Primigravidae und „Frauen mit ein oder zwei Vor-Schwangerschaften“ ergibt sich dagegen kein signifikanter Unterschied bezüglich der Häufigkeit von HPA-Antikörpern ( $\alpha=1,000$ ). Wie bereits erwähnt, kamen bei den Primigravidae keine thrombozytären Antikörper vor. Von den insgesamt 44 Frauen

mit ein oder zwei Vor-Schwangerschaften bildete eine Frau HPA-Antikörper (Anti-HPA 5b) aus.

Der Vergleich von Multigravidae mit Frauen, die ein oder zwei Mal zuvor schwanger waren, ergibt bzgl. der Häufigkeit von HPA-Antikörpern im Chi-Quadrat-Test nach Pearson eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha=0.047$ . Die errechneten Unterschiede bezogen auf das Auftreten von HPA-Antikörpern (20% (n=3) in der Gruppe der Multigravidae sowie 2,3% (n=1) in der Gruppe der Frauen mit ein oder zwei früheren Schwangerschaften) sind somit als signifikant anzusehen. Drei der insgesamt vier HPA-Antikörper positiven Probandinnen waren Multigravidae, die vierte Frau hatte zwei frühere Schwangerschaften.

Die Alpha-Adjustierung nach Shaffer/Holm der Irrtumswahrscheinlichkeiten der Einzelvergleiche „Primagravidae“, „Multigravidae“ und „Frauen mit ein oder zwei Vor-Schwangerschaften“ kommt zu dem Schluss, dass HPA-Antikörper signifikant häufiger in der Gruppe der Multigravidae nachgewiesen werden, als in den anderen beiden Gruppen.

#### **4.3.3 Thrombozyten- und HLA-Antikörper in Abhängigkeit von der Zahl vorhergehender Schwangerschaften**

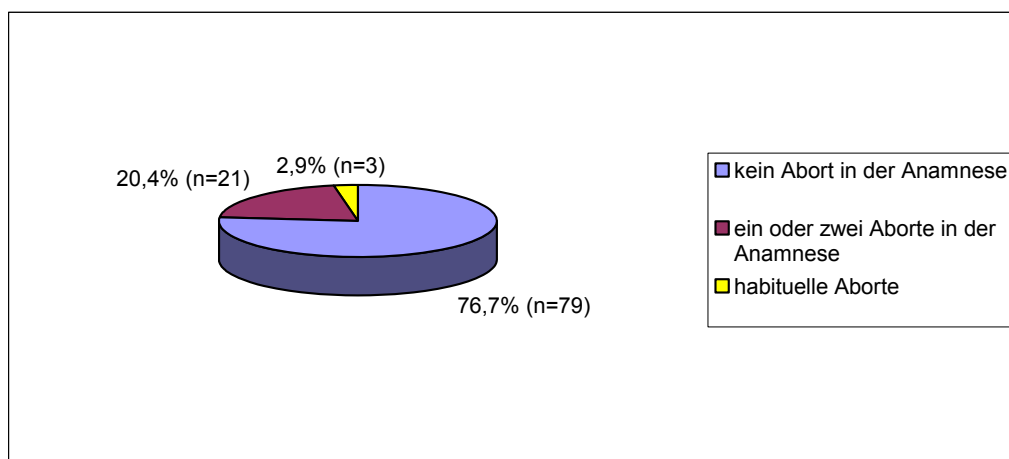
Von den drei Probandinnen, bei denen HLA- und HPA-Antikörper gefunden wurden, gehören zwei zur Gruppe der Multigravidae. Probandin #43 war zwei Mal zuvor schwanger. In ihrem Serum konnten in der 5. SSW der jetzigen Schwangerschaft weder HLA-, noch HPA-Antikörper gefunden werden. In SSW 24 reagierte der QUIKSCREEN® positiv (Differenzierung mittels Luminex-Technologie unspezifisch, Titer im ELISA 1:64). Die Kontrolluntersuchung des mütterlichen Serums in SSW 31 ergab zusätzlich positive Befunde im LCT (PRA 48%, Spezifität unspezifisch) sowie im PAK®2-LE und PAKPLUS®. Im angeschlossenen MAIPA konnte ein Anti-HPA 5b Antikörper mit einem Titer von 1:1 identifiziert werden.

In der Serumprobe von Probandin #89 (SSW 7) wurden mittels LABScreen® HLA Klasse II Single Anti-HLA DR4 Antikörper gefunden. Der aufgrund positiver Ergebnisse im PAK®2-LE und PAKPLUS® angeschlossene MAIPA zeigte Anti-HPA 5b Antikörper mit einem Titer von 1:64. Die Probandin erlitt einen Abort in der Frühschwangerschaft.

Bei Probandin #109 wurden HLA-Antikörper der Klasse I (Anti-HLA A2, A28, B13 (mittels LCT) und Anti-HLA B49, B44, B47, B59 (mittels LABScreen® HLA Klasse I Single)) sowie der Klasse II (Anti-HLA DR12, DR7, DR9, DR53, DR52, DQ2, DQ9 (mittels LABScreen® HLA Klasse II Single)) nachgewiesen. Gleichzeitig zeigten sich im MAIPA Anti-HPA 5b Antikörper. Auf die Schwangerschaftsverläufe sowie auf den postnatalen Status der Kinder der drei beschriebenen Frauen wird unter 4.6 und 5.6 explizit eingegangen.

Aufgrund der geringen Fallzahl wurde auf eine Signifikanztestung verzichtet.

#### ***4.4 Häufigkeit von Thrombozyten- und HLA-Alloantikörpern in Abhängigkeit von der Zahl vorhergehender Aborte***

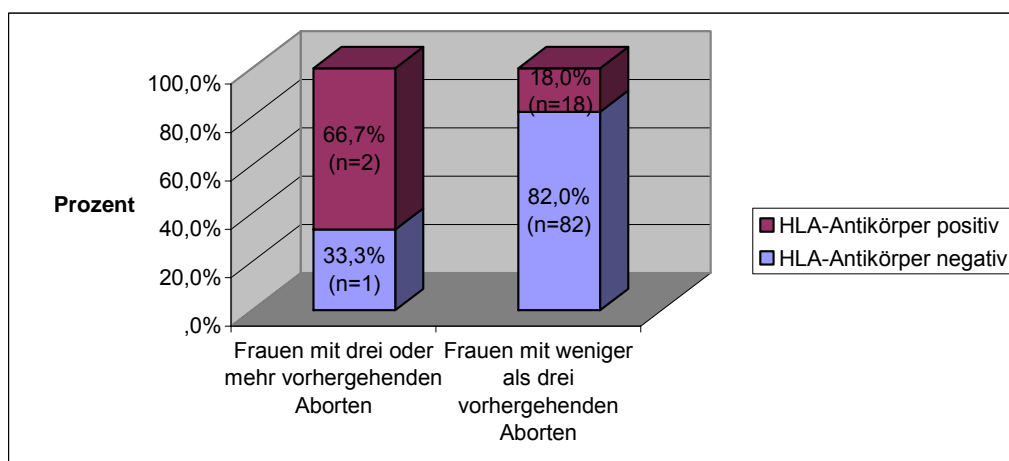


**Abbildung 13: Häufigkeit früherer Aborte in der untersuchten Kohorte**

Wie Abbildung 13 zeigt, hatten 76,7% (n=79) der Probandinnen nie zuvor einen Abort. Habituelle Aborte, das heißt drei oder mehr Aborte in der Anamnese, lagen bei 2,9% (n=3) der 103 befragten Frauen vor. 20,4% (n=21) gaben an, ein oder zwei Mal zuvor einen Abort erlitten zu haben.

#### 4.4.1 HLA-Antikörper in Abhängigkeit von der Zahl vorhergehender Aborte

Vergleicht man die Auftretenswahrscheinlichkeit von HLA-Antikörpern bei Frauen ohne früheren Abort mit der von Frauen, die mindestens einen Abort in ihrer Anamnese hatten, so zeigt sich, dass 15,2% (n=12) der Probandinnen ohne früheren Abort und 33,3% (n=8) der Frauen mit mindestens einem vorhergehenden Abort HLA-Antikörper aufwiesen. Das errechnete  $\alpha$ -Niveau hierfür liegt bei  $\alpha=0,074$ . Somit ist dieser Zusammenhang nicht signifikant. Das relative Risiko für das Auftreten von HLA-Antikörper ist bei Frauen mit mindestens einem früheren Abort signifikant 2,19-mal höher, als bei den Frauen, die noch nie einen Abort hatten (95% Konfidenzintervall von 1,02 bis 4,74).



**Abbildung 14: HLA-Antikörper bei Frauen mit drei oder mehr vorhergehenden Aborten und bei Frauen mit weniger als drei Aborten in der Anamnese**

Abbildung 14 zeigt, dass 66,7% (n=2) der Frauen mit habituellen Aborten HLA-Antikörper ausbildeten, dagegen nur 18,0% (n=18) der untersuchten Frauen, die weniger als drei frühere Aborte hatten. Im Chi-Quadrat-Test nach Pearson ergibt sich hierfür eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha=0,096$ . Somit besteht für diesen Zusammenhang keine Signifikanz. Das relative Risiko HLA-Antikörper zu entwickeln, ist bei Frauen mit drei oder mehr Aborten in der Anamnese 3,70-mal höher, als bei den Probandinnen, die weniger als drei Aborte erlitten. Das 95%-Konfidenzintervall von 1,50 bis 9,14 belegt, dass dieser Unterschied signifikant ist.

Auch der Vergleich der Gruppe „kein vorhergehender Abort“ (HLA-Antikörnernachweis in 15,2% (n=12)) mit der Gruppe „habituelle Aborte“ (HLA-Antikörnernachweis in 66,7% (n=2)) bzgl. des Auftretens von HLA-Antikörpern lieferte keinen signifikanten Zusammenhang. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha=0,074$  wurde die Signifikanzschranke deutlich überschritten. Das relative Risiko für die Ausbildung von HLA-Antikörpern ist jedoch unter Frauen mit habituellen Aborten signifikant 4,39-mal höher, als bei Frauen ohne früheren Abort (95%-Konfidenzintervall von 1,69 bis 11,36).

Die Gegenüberstellung der Häufigkeiten von HLA-Antikörper in den Gruppen „kein früherer Abort“ und „ein oder zwei frühere Aborte“ zeigte, dass, wie oben bereits erwähnt, 15,2% (n=12) der Frauen ohne vorhergehenden Abort die untersuchten Antikörper aufwiesen. Im Gegensatz dazu fand man bei 28,6% (n=6) der Probandinnen mit ein oder zwei früheren Aborten Antikörper gegen HLA. Der Chi-Quadrat-Test ergab eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha=0,200$  und somit keine Signifikanz für diesen Zusammenhang.

Auch das  $\alpha$ -Niveau für den Vergleich der Gruppen „ein oder zwei frühere Aborte“ und „habituelle Aborte“ bzgl. der Häufigkeit von HLA-Antikörpern lag mit  $\alpha=0,526$  deutlich über der Signifikanzschranke.

Die Beurteilung der p-Werte der drei zuletzt genannten Einzelhypothesen durch Alpha-Adjustierung nach Shaffer und Holm erbrachte ebenfalls keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der Zahl früherer Aborte und dem Auftreten von HLA-Antikörpern.

#### **4.4.2 thrombozytäre Antikörper in Abhängigkeit von der Zahl vorhergehender Aborte**

97,5% (n=77) der Frauen, welche angegeben hatten, noch nie einen Abort erlitten zu haben, waren HPA-Antikörper negativ. Dasselbe traf für 91,7% (n=22) der Probandinnen zu, die mindestens einen Abort in der Anamnese hatten. Dieser Unterschied ist bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha=0,231$  als nicht signifikant anzusehen. In der Gruppe „habituelle Aborte“ lagen bei 33,3% (n=1) thrombozytäre Antikörper vor. Bei den Frauen mit weniger als drei vorhergehenden Aborten in der Anamnese trat dieses Ereignis in 3,0% (n=3) der Fälle auf (Tab. 4).

**Tabelle 4: HPA-Antikörper bei Frauen mit habituellen Aborten sowie bei Frauen mit weniger als drei vorhergehenden Aborten**

		HPA-Antikörper		Gesamt
		negativ	positiv	
Frauen mit drei oder mehr vorherg. Aborten	Anzahl	2 66,7%	1 33,3%	3 100,0%
Frauen mit weniger als drei vorherg. Aborten	Anzahl	97 97,0%	3 3,0%	100 100,0%
Gesamt	Anzahl	99 96,1%	4 3,9%	103 100,0%

Hierfür besteht keinen signifikanter Zusammenhang ( $\alpha=0,113$ ). Allerdings erwies sich das relative Risiko für die Bildung thrombozytärer Antikörper bei Frauen mit habituellen Aborten als signifikant 11,1-mal höher, als bei Frauen mit weniger als drei früheren Aborten (95%-Konfidenzintervall von 1,58 bis 78,11).

Nur bei 2,5% ( $n=2$ ) der Frauen ohne vorhergehenden Abort traten Thrombozytenantikörper auf. Wie oben bereits beschrieben, waren diese dagegen bei 33,3% ( $n=1$ ) Probandinnen mit habituellen Aborten zu finden. Auch für diesen Zusammenhang ergab sich im Chi-Quadrat-Test nach Pearson mit einem  $\alpha$ -Niveau von  $\alpha=0,107$  keine Signifikanz. Es besteht jedoch ein 13,2-mal höheres, signifikantes relatives Risiko für die Ausbildung von HPA-Antikörpern bei Frauen mit habituellen Aborten, als bei Frauen ohne früheren Abort (95%-Konfidenzintervall von 1,60 bis 111,11).

In der Gruppe der Probandinnen mit ein oder zwei vorhergehenden Aborten zeigten 4,8% ( $n=1$ ) HPA-Antikörper, in der Gruppe der Frauen ohne frühere Aborte waren es 2,5% ( $n=2$ ). Dieser Zusammenhang ist mit einem  $\alpha$ -Niveau von  $\alpha=1,000$  nicht signifikant. Selbiges gilt für den Vergleich der Gruppe „habituelle Aborte“ mit der Gruppe „ein oder zwei frühere Aborte“: Hier liegt die Irrtumswahrscheinlichkeit mit  $\alpha=0,239$  deutlich über der Signifikanzschranke von  $\alpha=0,05$ .

Auch die Alpha-Adjustierung nach Shaffer und Holm erbringt für die Mehrhypothesenbetrachtung der drei Gruppen „kein früherer Abort“, „ein bis zwei frühere Aborte“ und „habituelle Aborte“ keine signifikanten Zusammenhänge.

#### **4.4.3 Thrombozyten- und HLA-Antikörper in Abhängigkeit von der Zahl vorhergehender Aborte**

Zwei der drei Probandinnen, die gleichzeitig HLA- und HPA-Antikörper aufwiesen, hatten noch nie einen Abort. Es handelt sich um die bereits unter 4.3.3 besprochenen Probandinnen #89 (Anti-HLA DR4 und Anti-HPA 5b) und #43 (unspezifische Ergebnisse im QUIKSCREEN®, LCT und LABScreen® HLA Klasse I Single sowie Nachweis von Anti-HPA 5b). Bei der dritten Probandin (#109) fand sich ein Abort in der Anamnese. Im Serum dieser Frau wurden Antikörper gegen HLA A2, A28, B13 (mittels LCT), gegen HLA B49, B44, B47, B59 (mittels LABScreen® HLA Klasse I Single) und gegen HLA DR12, DR7, DR9, DR53, DR52, DQ2, DQ9 (mittels LABScreen® HLA Klasse II Single) sowie Anti-HPA 5b Antikörper gefunden. In den Kapiteln 4.6 und 5.6 werden diese Fälle ausführlicher besprochen.

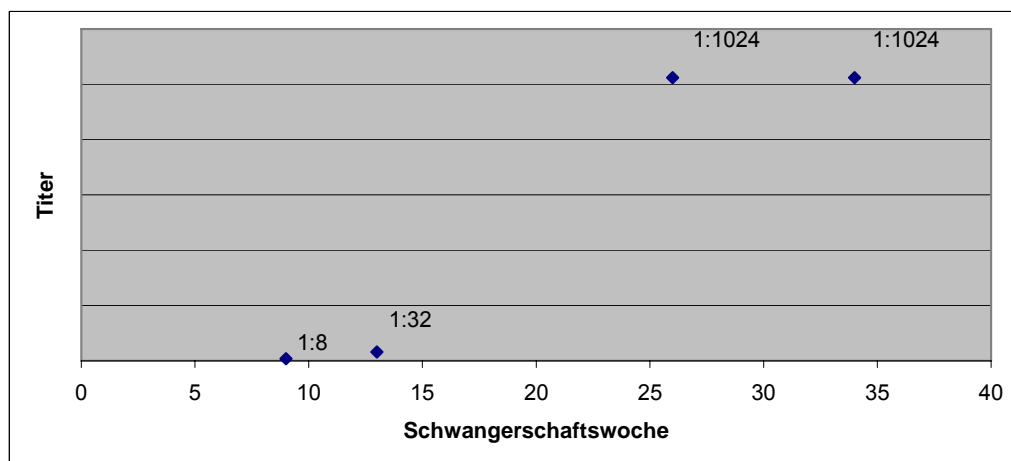
Aufgrund der geringen Fallzahl wurde an dieser Stelle auf eine Signifikanztestung verzichtet.

#### **4.5 Darstellung von Titerverläufen ausgewählter Fälle**

Um Aussagen zum Titerverlauf der nachgewiesenen HLA- und HPA-Antikörper treffen zu können, mussten Blutproben von mindestens drei unterschiedlichen Zeitpunkten der Schwangerschaft vorliegen. Die Titerbestimmung der HLA-Antikörper erfolgte mittels ELISA. Der indirekte MAIPA wurde zur Titerermittlung der HPA-Antikörper hinzugezogen.

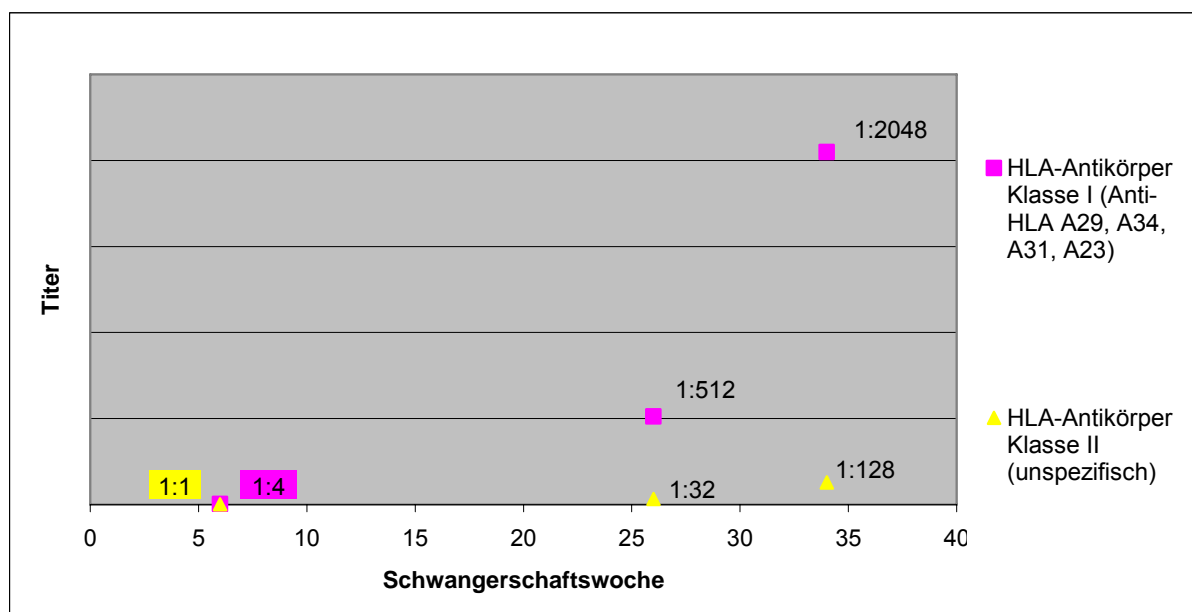
Statistische Untersuchungen konnten aufgrund des geringen Kohortenumfanges sowie aufgrund der großen Abstände zwischen den einzelnen Blutentnahmen nicht durchgeführt werden.





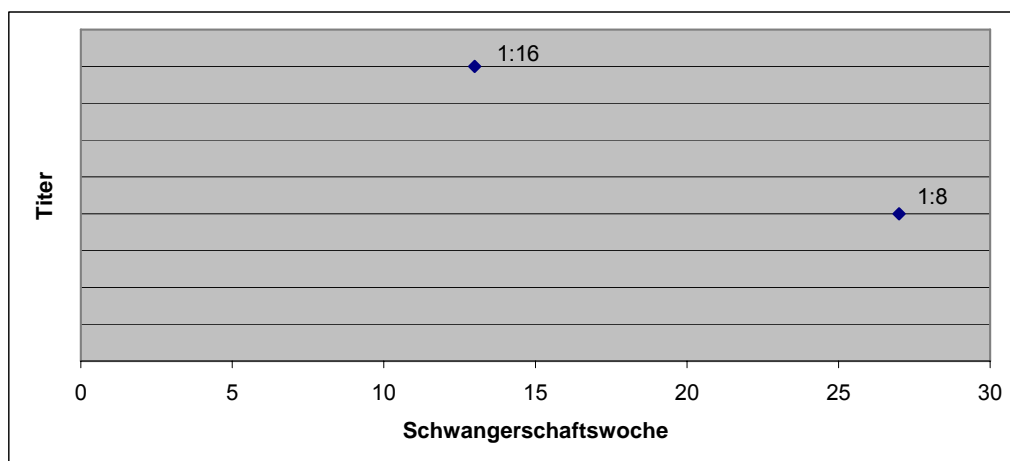
**Abbildung 15: Titerverlauf der HLA-Antikörper Klasse I bei Probandin #10**

Abbildung 15 stellt den Titerverlauf der HLA-Antikörper der Klasse I (unspezifisches Ergebnis im LABScreen® HLA Klasse I Single) bei Probandin #10, einer Frau mit einer vorhergehenden Schwangerschaft, dar. In Woche neun der jetzigen Schwangerschaft betrug der Titer 1:8. Die Untersuchung der nächsten Probe in SSW 13 ergab einen Titer von 1:32. Bis zur 26. Schwangerschaftswoche stieg dieser auf 1:1024 an. Eine letzte Kontrolle in der 34. SSW zeigte denselben Wert. Die Geburt des klinisch unauffälligen Kindes erfolgte in SSW 38. Bei dem Neugeborenen erfolgte postnatal keine Untersuchung des Blutbildes bzw. der Gerinnungswerte.



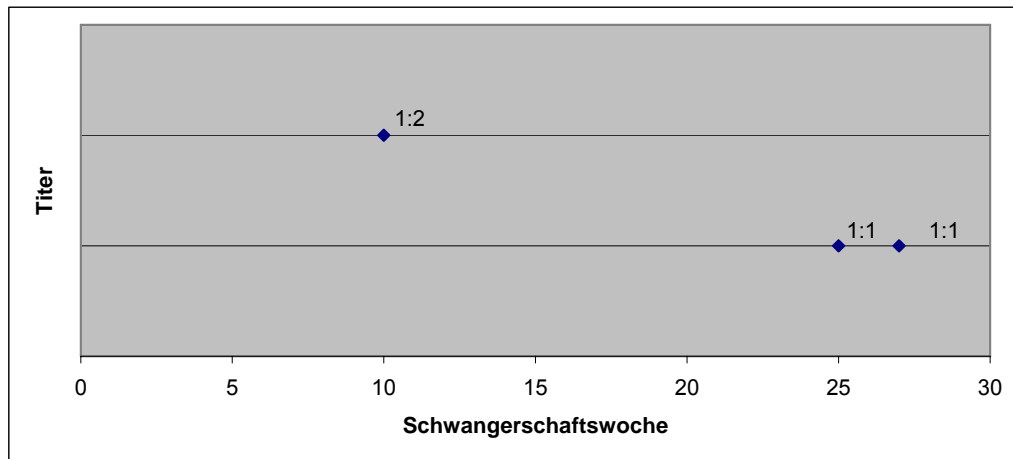
**Abbildung 16: Titerverlauf der HLA-Antikörper Klasse I und II bei Probandin #19**

Auch im Fall von Probandin #19, welche ebenfalls eine frühere Schwangerschaft aufweist, war – wie in Abbildung 16 dargestellt – ein steigender Titer im Verlauf der Schwangerschaft zu beobachten. Bei der ersten Untersuchung in SSW 6 ergaben sich ein Titer von 1:4 für HLA-Antikörper der Klasse I sowie ein Titer von 1:1 für HLA-Antikörper der Klasse II. In SSW 26 betrug der Titer 1:512 für HLA-Antikörper der Klasse I und 1:32 für HLA-Antikörper der Klasse II. Die abschließende Kontrolle in der 34. SSW zeigte einen Titer von 1:2048 für HLA-Antikörper der Klasse I sowie einen Titer von 1:128 für HLA-Antikörper der Klasse II. In SSW 39 kam es zur Geburt eines lebensfrischen, eutrophen Mädchens. Auch in diesem Fall erfolgte keine postnatale Blutuntersuchung des Neugeborenen.



**Abbildung 17: Titerverlauf der HLA-Antikörper Klasse I bei Probandin #56**

Im Gegensatz zu den beiden eben beschriebenen Frauen nahm bei Probandin #56 – einer Schwangeren mit Antikörpern gegen HLA B56, B63, B50, B72, B62, B49, B71 und B46 – die Verdünnungsstufe, in welcher der QUIKSCREEN® noch positiv ausfiel, im Verlauf der Schwangerschaft von 1:16 in SSW 13 auf 1:8 in SSW 27 ab (Abb. 17). Bei einer Kontrolluntersuchung in SSW 36 konnten keine HLA-Antikörper der Klasse I nachgewiesen werden. Drei Wochen später erfolgte die Geburt eines Mädchens, welches klinisch initial das Bild einer respiratorischen Anpassungsstörung bot. Dieser Zustand besserte sich nach kurzer Zeit. Eine Blutbildkontrolle sowie die Ermittlung des Gerinnungsstatus erfolgten nicht.



**Abbildung 18: Titerverlauf der HLA-Antikörper Klasse I bei Probandin #23**

Bei Probandin #23 (Abb. 18) änderte sich der Titer der HLA Klasse I Antikörper (Anti-HLA A23, A24, A25, A32, B13, B57, B63, B59, B38) im Schwangerschaftsverlauf dagegen kaum: in SSW 10 betrug er 1:2, in den Wochen 25 und 37 lag er bei 1:1.

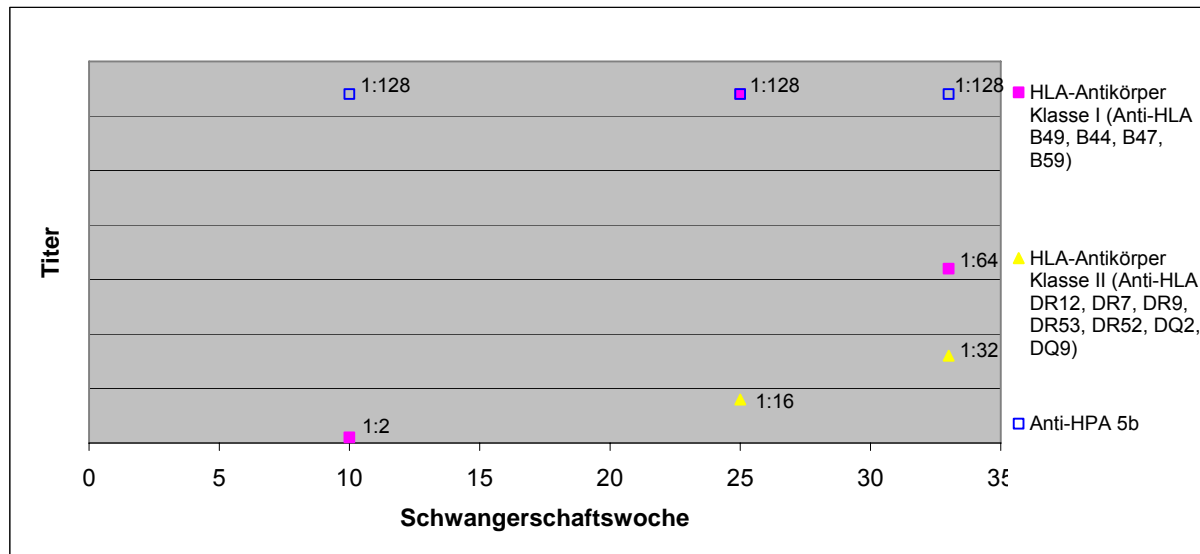
18 der insgesamt 20 Frauen mit HLA-Antikörpern wiesen bereits in der ersten Serumprobe Antikörper auf. Bei zwei Schwangeren fiel der HLA-Antikörper Suchtest erstmals in der 24. SSW positiv aus, beispielsweise bei Probandin #43 (Tabelle 5):

**Tabelle 5: Titer der HLA-Antikörper Klasse I sowie des Anti-HPA 5b Antikörpers bei Probandin #43**

	HLA-Antikörper Klasse I	HPA-Antikörper
SSW 5	negativ	negativ
SSW 24	unspezifisch (1:64)	negativ
SSW 31	unspezifisch (1:32)	Anti-HPA 5b (1:1)

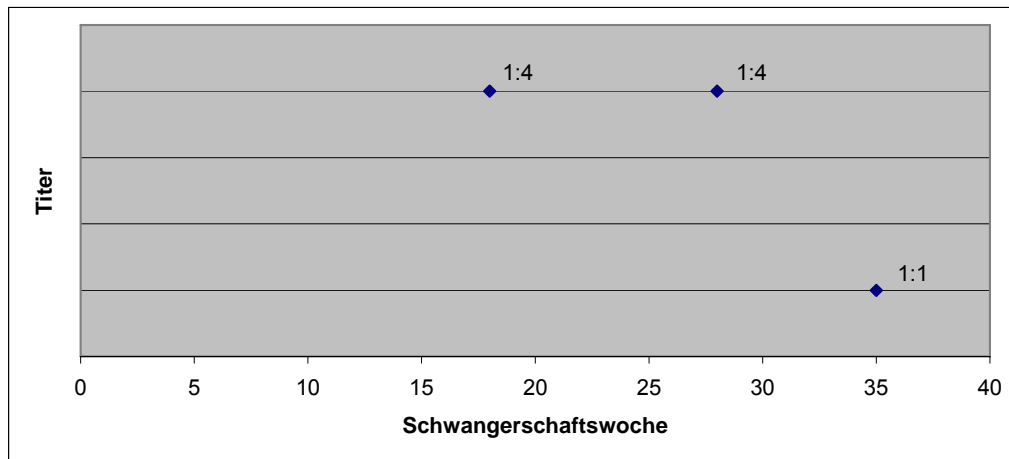
Bei der ersten Untersuchung in SSW 5 zeigten sich keine Antikörper. In SSW 24 wurden HLA-Antikörper der Klasse I mit einem Titer von 1:64 gefunden. Bei einer weiteren Kontrolle in SSW 31 war der Titer auf 1:32 gesunken. Zusätzlich konnten niedrig titrige Anti-HPA 5b Antikörper nachgewiesen werden (Titer 1:1). Die Geburt erfolgte in SSW 39. Das Neugeborene wurde als lebensfrisch, reif und mit rosigem

Hautkolorit beschrieben. Klinischer Anhalt für eine Thrombozytopenie bestand nicht. Eine postnatale Blutbildkontrolle wurde nicht durchgeführt.



**Abbildung 19: Titerverlauf der HLA-Antikörper Klasse I und II sowie des Anti-HPA 5b Antikörpers bei Probandin #109**

Im Fall von Probandin #109 wurden HLA-Antikörper der Klasse I, der Klasse II sowie Anti-HPA 5b Antikörper nachgewiesen (Abbildung 19). In der zehnten SSW fanden sich bei dieser Frau HLA-Antikörper der Klasse I sowie Anti-HPA 5b Antikörper. Bei erneuten Untersuchungen in Schwangerschaftswoche 25 wurden zusätzlich HLA Klasse II Antikörper nachgewiesen. Der Titer der HLA Klasse I Antikörper stieg von 1:2 in SSW 10 auf 1:128 in SSW 25 an. In SSW 33 betrug er 1:64. Die HLA-Antikörper Klasse II zeigten einen diskreten Anstieg von 1:16 in SSW 25 auf 1:32 in SSW 33. Der Titer des bereits in der zehnten SSW entdeckten Anti-HPA 5b Antikörpers lag zu allen drei Messzeitpunkten konstant bei 1:128. Die Entbindung erfolgte im Rahmen einer Hausgeburt.



**Abbildung 20: Titerverlauf des Anti-HPA 1a Antikörpers bei Probandin #42**

Bei Probandin #42, einer Frau mit habituellen Aborten unklarer Genese, wurden in SSW 8 Anti-HPA 1a Antikörper nachgewiesen. Eine Titerbestimmung war zu diesem Zeitpunkt wegen unzureichender Materialmenge nicht möglich. In SSW 18 betrug der Titer 1:4. Einen unveränderten Wert zeigte auch die Kontrolluntersuchung in SSW 28. Sieben Wochen später wurde ein Titer von 1:1 gemessen (Abbildung 20). Unter engmaschiger gynäkologischer Betreuung und durch Anlage einer prophylaktischen Cerclage konnte eine Schwangerschaftsdauer von 40 Wochen und vier Tagen erreicht werden. Dann erfolgte bei fehlender Wachstumstendenz und pathologischem CTG eine Sectio caesarea. Die Haut des neugeborenen, lebensfrischen Mädchens zeigte sich blande. Petechien traten nicht auf. Blutbild und Gerinnungsstatus des Kindes wurden nicht untersucht.

Probandin #89 erlitt – nach drei früheren Geburten – in der aktuell beobachteten Schwangerschaft einen Frühabort. Die HPA-Antikörperdiagnostik in SSW 7 hatte einen Anti-HPA 5b Antikörper mit einem Titer von 1:64 ergeben.

#### **4.6 Status der Neugeborenen von Müttern mit HLA- bzw. HPA-Antikörpern**

Insgesamt konnten bei 21 Schwangeren Antikörper im Serum nachgewiesen werden. Von diesen erlitten zwei Frauen einen Abort. Die übrigen 19 Probandinnen beendeten die Schwangerschaft mit einer Lebendgeburt, wobei eine der Geburten im häuslichen Milieu erfolgte. 18 Entbindungen fanden in entsprechenden

Geburtskliniken statt. Durch Recherche in den entsprechenden Krankenblättern konnte in diesen Fällen der postnatale Status der Kinder genauer herausgearbeitet werden, wobei eine Krankenakte aus unersichtlichen Gründen nicht auffindbar war und daher nicht studiert werden konnte.

Nur bei fünf der 17 betrachteten Kinder wurde in den ersten Lebenstagen eine Blutbildkontrolle durchgeführt. Bei dem Neugeborenen von Probandin #6 (Geburt in SSW 38) stellte die Indikation dafür ein ausgeprägter Ikterus dar. Der Hämoglobinspiegel war mit 8,87mmol/l (9,3-14,9mmol/l), ebenso wie der Hämatokrit mit 43% (50-70%), diskret erniedrigt. Im Serum der Mutter, welche bereits viermal zuvor schwanger war (eine Geburt, drei Aborte), waren während der Schwangerschaft komplementabhängige HLA-Antikörper gegen HLA-B27 und HLA-B61 gefunden worden. Die Leukozyten des Kindes zeigten sich am Tag der Geburt mit 19,9 GPT/l (5,0-19,5GPT/l) minimal erhöht. Mit 395GPT/l (300-750GPT/L) lag die kindliche Thrombozytenzahl im Normalbereich.

Aufgrund von transitorischer Tachypnoe und stöhnender Atmung wurde bei dem am Termin geborenem Kind von Probandin #34 eine Blutbildkontrolle durchgeführt. Im Serum der Mutter, welche bereits zweimal zuvor schwanger war, zeigte sich während der Schwangerschaft ein komplementabhängiger HLA-Antikörper (Anti-HLA A19). Auch QUIKSCREEN® und LABScreen® Mixed reagierten positiv. Der LABScreen® HLA Klasse I Single erbrachte jedoch einen unspezifischen Befund. Der Titer lag sowohl in SSW 7 als auch in SSW 20 bei 1:128. Im Blutbild des Kindes vom Tag der Geburt fiel, bei unauffälligen Werten für Hämoglobin, Hämatokrit und Leukozyten, eine diskrete Erniedrigung der Thrombozytenzahl auf 278GPT/l (300-750GPT/l) auf. Die Blutgerinnung wurde – wie bei den anderen Neugeborenen auch – nicht untersucht. Klinisch wurde das Kind als reif Geborenes mit rosiger Haut beschrieben. In der weiterführenden Diagnostik zeigten sich ein Vorhofseptumdefekt und eine geringgradige Trikuspidalklappeninsuffizienz.

Im Serum von Probandin #38, welche bereits einmal zuvor schwanger war, wurden in SSW 24 HLA-Antikörper, welche gegen HLA-A23, HLA-A 24, HLA-A80 und HLA-A1 gerichtet waren, mit einem Titer von 1:16 gefunden. Weitere Blutentnahmen zur besseren Beurteilung des Titerverlaufes wurden abgelehnt. Das Blutbild des in SSW 38 entbundenen, klinisch unauffälligen Kindes, ergab normwertige Thrombozyten-

und Leukozytenzahlen. Lediglich der Hämoglobinspiegel war mit 8,25mmol/l (9,3-14,9mmol/l) etwas erniedrigt.

Bei Probandin #60 (drei vorhergehende Schwangerschaften) musste aufgrund eines Blasensprunges in SSW 31 + 4 eine Sectio durchgeführt werden. Die Antikörperdiagnostik im mütterlichen Serum ergab niedrig titrige (1:4 in SSW 6 sowie 1:2 in SSW 24) Antikörper gegen HLA-A1 (QUIKSCREEN® und LABScreen® HLA Klasse I Single) und HLA-DR7 (LABScreen® HLA Klasse II Single). Am Tag der Geburt fiel im Blutbild des Kindes eine mit 4,18TPT/l (4,4-6,6TPT/l) diskret erniedrigte Erythrozytenzahl bei normwertigem Hämoglobinspiegel auf. Weiterhin zeigten sich eine Leukozytopenie von 6,8GPT/l (9,0-34GPT/l) sowie eine Thrombozytopenie von 246GPT/l (300-750GPT/l) bei – bis auf das erniedrigte Geburtsgewicht – klinisch unauffälligem Befund. Am dritten Lebenstag hatten sich die Werte für Erythrozyten und Leukozyten bereits normalisiert. Die Thrombozytenzahl war auf 294GPT/l (300-750GPT/l) angestiegen. Blutbildkontrollen am Ende der zweiten und vierten Lebenswoche zeigten durchgehend Normalbefunde.

Ein in der direkten Blutverwandtschaft aufgetretenes adrenogenitales Syndrom stellte die Indikation für eine postnatale Blutbild- und Elektrolytkontrolle bei dem Kind von Probandin #84 dar. Bei dieser Frau, welche eine Spontangeburt, eine Interruptio und zwei Aborte (in SSW 4 und 11) in ihrer Anamnese führt, reagierte der LCT in SSW 8 und SSW 25 mit einer PRA von 95% bzw. 60% unspezifisch positiv bei negativen Ergebnissen in den ELISA's. Mit Hilfe des LABScreen® Mixed und LABScreen® HLA Klasse I Single wurden HLA-Antikörper der Klasse I, welche gegen HLA-A23 und HLA-A24 gerichtet waren, detektiert. Im Blutbild des in der 38. SSW geborenen, klinisch unauffälligen Kindes stellte sich die Thrombozytenzahl mit 295GPT/l (300-750GPT/l) minimal erniedrigt dar.

Bei Betrachtung der klinischen Status der 17 Neugeborenen zeigten drei Kinder ein ikterisches Hautkolorit, wobei in einem Fall ein positiver direkter Coombstest vorlag. Petechien, Haut- oder Schleimhautblutungen, subkonjunktivale Blutungen und anderweitige Zeichen von Gerinnungsstörungen wurden bei keinem der 17 betrachteten Kinder gesehen. Anatomische Fehlbildungen oder neurologische Ausfälle traten ebenfalls nicht auf. Ein männlicher Neugeborener hatte beidseitig Hydrozelen. Bei zwei Neugeborenen waren respiratorische Anpassungsstörungen zu verzeichnen. Das Fruchtwasser stellte sich bzgl. Farbe und Menge bei 16

Neugeborenen regelrecht dar. Nur Probandin #66, bei der die Geburt in SSW 37 + 2 bei dringendem Verdacht auf Plazentainsuffizienz eingeleitet wurde, zeigte eine grüne Fruchtwasserfarbe mit reduzierter Fruchtwassermenge.

Bei neun der 17 Kinder wurde ein direkter Coombstest durchgeführt. In zwei Fällen fiel dieser positiv aus, wobei der Antikörper Suchtest während der Schwangerschaft bei beiden betroffenen Frauen stets negativ war. Probandin #6 gebar in SSW 38 durch primäre Sectio ein lebensfrisches, ikterisches Kind, welches ansonsten klinisch unauffällig war. Die Blutgruppe der Mutter war 0 D, die des Kindes A D. Neben dem positivem direktem Coombstest und einer diskreten Anämie (Hämoglobinspiegel 8,87mmol/l (9,3-14,9mmol/l)) fiel eine Gesamtbilirubinkonzentration von 305,2µmol/l (<22,5µmol/l) auf. In Zusammenschau dieser Befunde wurde eine Hyperbilirubinämie im Rahmen einer AB0-Blutgruppeninkompatibilität diagnostiziert, welche mittels Fototherapie behandelt wurde. Nach vier Tagen war der Gesamtbilirubinspiegel auf 261,1µmol/l (<22,5µmol/l) gesunken und der Ikterus regredient. Bei dem Neugeborenem von Probandin #87, einer III. Gravida mit Zustand nach Transfusion von Erythrozytenkonzentraten im Rahmen einer früheren Sectio, fiel der direkte Coombstest ebenfalls positiv aus. Die Blutgruppe der Mutter lautete B d, die des Kindes 0 D. Der indirekte Coombstest mit mütterlichem Serum ergab drei Mal (zuletzt durchgeführt in der 35. SSW) negative Ergebnisse. Das Kind zeigte ein rosiges, nicht ikterisches Hautkolorit. Untersuchungen des kindlichen Blutbildes bzw. des Gesamtbilirubinspiegels wurden nicht durchgeführt.

Insgesamt mussten drei der 17 Kinder auf neonatologischen Stationen betreut werden: Bei dem Neugeborenen von Probandin #6 erfolgte, wie bereits erwähnt, eine Fototherapie. Das Kind von Probandin #34 wurde bei transitorischer Tachypnoe durch die Pädiater überwacht. Aufgrund der Frühgeburt in SSW 31 + 4 musste das Neugeborene von Probandin #60 einen Monat neonatologisch betreut werden.



## 5 Diskussion

### ***5.1 Häufigkeit von erythrozytären, thrombozytären und HLA-Alloantikörpern in der Schwangerschaft***

Mit Hilfe der im Kapitel „Methodik“ beschriebenen Verfahren wurden die Seren der 103 Probandinnen auf das Vorliegen von erythrozytären, thrombozytären und HLA-Antikörpern untersucht. Zum Beweis einer feto-maternalen Inkompatibilität, ausgelöst durch Antigene, die der Fetus vom Vater geerbt hat, sind zusätzlich zu den serologischen Tests noch weitere Untersuchungen nötig. Nur durch Antigen-Typisierung der entsprechenden mütterlichen, väterlichen und kindlichen Zellen sowie durch einen Kreuztest zwischen Serum der Mutter und entsprechenden Blutzellen des Vaters lässt sich die feto-maternale Inkompatibilität als Ursache für die mütterliche Antikörperexpression sicher belegen. Die im maternalen Serum nachgewiesenen Antikörper können auch durch einen früheren Kontakt des mütterlichen Immunsystems mit fremden (Blutzell-)Antigenen entstanden sein, zum Beispiel im Rahmen einer Organtransplantation bzw. nach Transfusion von Blutprodukten.

Neben Geburten an sich können auch Amniozentesen im Rahmen der pränatalen Diagnostik, Placenta-Praevia-Blutungen, Abort-Curettagen oder anderweitige Manipulationen am Uterus (z.B. intrauterine Wendung) durch Einschwemmen fetaler Zellen in die mütterliche Zirkulation zur Sensibilisierung führen (Kitschke et al. 1985). Um präformierte Antikörper im mütterlichen Serum frühzeitig zu erkennen, wurde die Pflicht zur Durchführung von Antikörpersuchtests – jedoch nur für erythrozytäre Antikörper – in den Mutterschaftsrichtlinien verankert (Mutterschaftsrichtlinien des G-BA 1985). Festlegungen für entsprechende Untersuchungen auf vorliegende HPA- oder HLA-Antikörper existieren nicht.

Inwieweit die gebildeten Antikörper die Plazenta überqueren und an die fetalen Oberflächenantigene binden, kann mit der in dieser Studie angewandten Methodik nicht geklärt werden. Hierzu sind Untersuchungen des Fruchtwassers bzw. des fetalen Blutes nötig. Aufgrund der nicht unerheblichen Risiken einer

Fruchtwasserpunktion ist es ethisch nicht vertretbar, einer Kohorte gesunder schwangerer Frauen diese Untersuchung zu zumuten.

Von jeder Probandin wurde zu Studienbeginn ein Fragebogen (Muster siehe Anhang) ausgefüllt. Keine der untersuchten 103 Frauen hatte eine Transplantation in der Anamnese, vier Probandinnen gaben eine frühere Transfusion von Blutprodukten an. Bei drei dieser vier Schwangeren wurden HLA-Antikörper der Klasse I und II gefunden. Bei einer Probandin wurden trotz Transfusion in der Anamnese keine Antikörper nachgewiesen. Novotny et al. beobachtete in 31% eine HLA-Immunisierung durch frühere Schwangerschaften und Transfusionen (Novotny et al. 1995). Die Wahrscheinlichkeit einer HLA-Immunisierung durch eine Bluttransfusion ist dabei abhängig von der Zahl der übertragenen allogenen Leukozyten (Lefèvre et al. 1999). Nach Fisher et al. liegt die kritische Grenze bei Transfusion von mehr als  $5 \times 10^6$  Leukozyten pro Transfusion (Fisher et al. 1985). Adamzik konnte mit seiner Studie belegen, dass der Einsatz leukozytendepletierter Blutprodukte die Rate der HLA-Immunisierung deutlich vermindert (Adamzik et al. 1995). Die Gabe von nicht leukozytendepletierten Blutprodukten kann neben der HLA-Alloimmunisierung noch weitere unerwünschte Nebenwirkungen, wie zum Beispiel febrile nicht-hämolytische Transfusionsreaktionen, Immunsuppression sowie die Übertragung zellständiger Viren haben (Klein et al. 1998). In einer Untersuchung von van de Watering an kardiochirurgischen Patienten war die Sterblichkeit in der Gruppe der Patienten, die leukozytendepletierte Erythrozytenkonzentrate erhalten hatten, signifikant niedriger, als in der Gruppe, die nicht leukozytendepletierte Produkte bekamen (van de Watering et al. 1998). Nach eingehender Nutzen-Kosten-Abwägung entschloss sich das Paul-Ehrlich-Institut zur Einführung einer generellen Leukozytendepletion. Im Bundesanzeiger vom 14.09.2000 wurde folgendes bekannt gegeben: „Es dürfen ab dem 01.10.2001 ausschließlich solche Vollblute, Erythrozytenkonzentrate und Thrombozytenkonzentrate in Verkehr gebracht werden, deren Leukozytengehalt weniger als  $1 \times 10^6$  pro Einheit (Blutkonserve) beträgt“ (Bundesanzeiger Nr. 174 vom 14.09.2000). Das Grundprinzip der Leukozytendepletion beruht auf der Adhäsion von Leukozyten an Filterfasern, beispielsweise aus Polyester oder Polycarbon (Heuft 2007).

### 5.1.1 Häufigkeit erythrozytärer Antikörper

Der in den Mutterschaftsrichtlinien verankerte Antikörper Suchtest (indirekter Coombstest, siehe Kapitel 3.6) zu Beginn einer Schwangerschaft und dessen Wiederholung zwischen der 24. und 27. Schwangerschaftswoche liefert in etwa 99% der Fälle ein negatives Ergebnis (Lab28 2006). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam die aktuelle Studie: Hier fiel der Antikörpersuchtest in allen 103 Fällen negativ aus. Auch schwache Kälte- oder Wärmeautoantikörper, die in der pränatalen Diagnostik häufig nebenbefundlich zu finden sind (Lab28 2006), konnten nicht nachgewiesen werden. Lediglich die bei D-negativen Frauen durchgeführte präpartale Anti-D-Prophylaxe führte zu positiven Ergebnissen im Antikörpersuchtest. Dieser Befund ist von einer Immunisierung gegen Fremdantigene abzugrenzen.

Die häufigste Form des MHN wird durch AB0-Inkompatibilität ausgelöst und verläuft, im Gegensatz zur Rh-Inkompatibilität, klinisch oft mild, was der Fall von Probandin #6 (Blutgruppe 0) und ihrem neugeborenem Kind (Blutgruppe A) bestätigt. Neben dem positivem direktem Coombstest und einer diskreten fetalen Anämie (Hämoglobinspiegel 8,87mmol/l (9,3-14,9mmol/l)) fiel eine Gesamtbilirubinkonzentration von 305,2µmol/l (<22,5µmol/l) im Serum des Neugeborenen auf. Unter der eingeleiteten Fototherapie sank der Gesamtbilirubinspiegel nach vier Tagen auf 261,1µmol/l (<22,5µmol/l). Der initiale Ikterus zeigte sich regredient.

Nach Hoch wird die Bildung irregulärer erythrozytärer Antikörper zum Großteil durch Antigene des Rhesussystems ausgelöst. Nur in 10 – 35% (Hoch 1994) sind andere Blutgruppenantigene – vor allem Antigene des Kell-, Duffy-, MNS- und Kidd-Systems – dafür verantwortlich (Mueller-Eckhardt und Kiefel 2004). Nicht jeder labortechnisch nachgewiesene Antikörper wird klinisch relevant. Der Antikörper-Titer im mütterlichen Serum, der Anteil der die Plazenta überquerenden Antikörper, die Antigendichte auf den kindlichen Erythrozyten, die Phagozytosefähigkeit des fetalen retikuloendothelialen Systems, die Fähigkeit des Neugeborenen zur Bilirubinausscheidung sowie dessen Erythropoese-funktion beeinflussen den Verlauf des MHN (Mueller-Eckhardt und Kiefel 2004). Sehr hohe bzw. rasch ansteigende Titer, aber auch schnell abfallende Titer (als mögliches Anzeichen für den diaplazentaren Übertritt der maternalen Antikörper) sind als Alarmsignal zu werten. Hier sollte zeitnah weitere Diagnostik und gegebenenfalls Therapie erfolgen (Lab28

2006), um die möglicherweise gravierenden Folgen eines MHN, wie Fruchttod bei Hydrops fetalis oder einen Kernikterus, abzuwenden. 90% der Kinder mit Kernikterus versterben, 10% erleiden schwere neurologische Dauerschäden (Behrens und Schneider 2000). Um mögliche irreguläre erythrozytäre Antikörper im mütterlichen Serum frühzeitig aufdecken und Therapiemaßnahmen rechtzeitig einleiten zu können, schreiben die Mutterschaftsrichtlinien einen Antikörper Suchtest zu Beginn jeder Schwangerschaft sowie einen zweiten zwischen der 24. und 27. Schwangerschaftswoche vor (Mutterschaftsrichtlinien des G-BA 1985). Insgesamt sind heute 80% der maternalen Immunisierungen durch D-Inkompatibilität bedingt (Behrens et al. 1993). Ursachen sind unter anderem unterlassene Anti-D-Prophylaxe nach gynäkologischen Eingriffen und die zunehmende Einwanderung aus Ländern, in denen keine routinemäßige Prophylaxe erfolgt (Behrens und Schneider 2000). Hinzu kommt, dass, wie in einer Arbeit von Maas gezeigt, trotz prä- und postpartaler Anti-D-Prophylaxe 9 von 8063 (0,11%) rhesusnegativen Frauen immunisiert werden (Maas 1992). Eine Ursache dafür ist, dass die Wirkung des applizierten Anti-D Immunglobulins nur 12 Wochen anhält (daher können Nachinjektionen bei fortbestehender Schwangerschaft nötig sein) (Behrens und Schneider 2000). Behrens spricht zudem von einer tendenziellen Zunahme der absoluten und relativen Häufigkeit einer Immunisierung durch andere erythrozytäre Antikörper (Behrens und Schneider 2000). In Zusammenschau all dieser Aspekte ist die routinemäßige Durchführung eines Suchtests auf erythrozytäre Antikörper in der Schwangerschaft auch weiterhin unabdingbar und sollte daher in entsprechenden Richtlinien verankert bleiben.

### **5.1.2 Häufigkeit von HLA-Antikörpern**

Als Suchtest für HLA-Antikörper dienen neben dem komplementabhängigen LCT die auf der ELISA-Technik basierenden Tests QUIKSCREEN® und B-SCREEN®. In diesen Tests positiv reagierende Seren wurden dem auf der Luminex-Technologie basierenden LABScreen® Mixed als Bestätigungstest unterzogen. Ein Vergleich dieser beiden Methoden ist an dieser Stelle nicht möglich. Mehrere Studien zeigten jedoch, dass die Luminex-Technologie nicht nur kosteneffektiver, sondern auch deutlich sensitiver als das ELISA-Verfahren ist (Rhyne 2007).

Dieser Vorteil etablierte sich in der transfusionsmedizinischen Praxis leider erst im Verlauf der Studie. Nach dem heutigen Stand der Wissenschaft würde man den HLA-Antikörper Suchtest basierend auf der Luminex-Technik durchführen und auf die ELISA-Methode verzichten.

Erste Berichte über lymphozytotoxische Antikörper im Rahmen fetomaternaler Inkompatibilität stammen aus dem Jahre 1958 (Payne und Rolfs 1958, van Rood et al. 1958). Im Jahr 1970 untersuchte Terasaki 594 Schwangere auf das Vorliegen von HLA-Antikörpern und erhielt dabei in 38% ein positives Ergebnis. In 16% konnte er eine mögliche Antikörperbildung nicht ausschließen, bei 46% der untersuchten Frauen fand er keine Antikörper. Ähnliche Resultate lieferte eine Studie von Balasch: Hier wurden in 44% HLA-Antikörper nachgewiesen (Balasch et al. 1981), das heißt in mehr als doppelt so vielen Fällen, wie in der aktuell durchgeführten Studie. Dieser Unterschied könnte methodisch bedingt sein. Balasch nutzte für seine Untersuchungen das Prinzip des LCTs. In seiner Arbeit zeigten 66% der HLA-Antikörper positiven Schwangeren HLA-Antikörper der Klasse I, die restlichen 34% Antikörper gegen HLA-Antigene der Klasse I und II. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich auch in der aktuellen Studie: 55% (n=11) der Schwangeren mit HLA-Antikörper wiesen lediglich Antikörper gegen Klasse I Antigene auf, in 45% (n=9) der Fälle wurden zusätzlich Antikörper gegen Klasse II Antigene gefunden.

### **5.1.3 Häufigkeit thrombozytärer Antikörper**

Mit Hilfe des auf ELISA-Technik basierenden PAK<sup>®</sup>2-LE wurden die Seren der 103 Frauen auf Antikörperbildung gegen die thrombozytären Glykoproteine GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP Ia/IIa und GP IV untersucht. Als Bestätigungstest diente der indirekte MAIPA-Assay. Laut Fontana finden sich in 1% bis 1,5% der Schwangerschaften Alloantikörper gegen Plättchenantigene (Fontana 2009). In der jetzigen Studie war dies in 3,9% (n=4) der Schwangerschaften der Fall. Betrachtet man die Antikörperspezifitäten, so ließen sich in 25% (n=1) Anti-HPA 1a Antikörper nachweisen, in 75% (n=3) Anti-HPA 5b Antikörper. Diese Ergebnisse entsprechen nicht denen der aktuellen Literatur. In der klinischen Praxis findet man in 80% bis 90% der Fälle Anti-HPA 1a Antikörper und in etwa 18% Anti-HPA 5b Antikörper. Weniger als 4% der thrombozytären Alloantikörper werden durch andere

Antikörperspezifitäten verursacht (Neppert und von Witzleben-Schürholz 2007). Dieser Unterschied ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die geringe Fallzahl der aktuellen Studie zurückzuführen.

Die Inzidenz der NAIT ist etwa zehnmal niedriger als die der Alloantikörperbildung gegen thrombozytäre Antigene. Sie wird mit 1:2000 (Johnson 1997) bis 1:5000 (Mueller-Eckhardt und Kiefel 2004) angegeben. Es besteht eine Abhängigkeit zwischen klinischem Verlauf der NAIT und verursachender Antikörperspezifität. Anti-HPA 1a Antikörper findet man gehäuft bei schwergradigen, Anti-HPA 5b Antikörper oft bei milderer Formen (Neppert und von Witzleben-Schürholz 2007). Nach Mueller-Eckhardt und Kiefel sind auch Anti-HPA 3a und Anti-HPA 2b Antikörper mit schwerwiegenderen Verläufen assoziiert. Die Ursache für die oftmals mildere klinische Symptomatik bei NAIT durch Anti-HPA 5b Antikörper ist ihrer Meinung nach die deutlich niedrigere Zahl von Antigenbindungsstellen des HPA-5b Antigens auf dem GP Ia/Ia Komplex (ca. 2000/Plättchen) im Vergleich zum HPA-1a Antigen auf dem GP IIb/IIIa Komplex (ca. 40000/Plättchen) (Mueller-Eckhardt und Kiefel 2004).

In 20% bis 30% der NAIT-Fälle treten Hirnblutungen auf (Kaplan 2003). Das belegt einmal mehr, dass es sich hier um eine in jeder Hinsicht ernst zu nehmende und folgenschwere Krankheit handelt. Murphy deckte mit seiner Untersuchung in Großbritannien auf, dass ungefähr jede zweite NAIT auch durch einen Spezialisten nicht erkannt wird (Murphy 1999). Diese Diagnostiklücke hat nicht nur schwerwiegende Folgen für die aktuelle Schwangerschaft. Je nachdem, ob der Vater hetero- oder homozygot für das entsprechende Plättchenantigen ist, beträgt das Wiederholungsrisiko 50% oder gar 100%. Die Betreuung erneuter Schwangerschaften nach Auftreten einer NAIT sollte daher immer in einem Zentrum für Perinatal- und Transfusionsmedizin stattfinden.

Man geht davon aus, dass in Ländern mit konsequenter Anti-D-Prophylaxe die Häufigkeit der NAIT mittlerweile über der des rhesusbedingten MHN liegt (Obladen et al. 2006). Sollte dies nicht Anlass geben, über eine generelle (Früh-) Diagnostik der NAIT – ähnlich der des MHN – nachzudenken?

Diese Frage stellte sich auch Killie in der Studie „Cost-effectiveness of antenatal screening for neonatal alloimmune thrombocytopenia“. Er führte bei 100448 schwangeren Frauen eine HPA 1a Typisierung durch. HPA 1a negative Frauen wurden auf HPA-Antikörper untersucht. Lag eine Immunisierung vor, wurde zwei bis

vier Wochen vor dem errechneten Geburtstermin eine Sectio caesarea durchgeführt. HPA-1a negative Thrombozytenkonzentrate wurden für den Fall eines thrombozytopenischen Neugeborenen in Bereitschaft gehalten (Killie et al. 2007). Durch diese Art des Screenings bzw. der Intervention konnte die Zahl schwerer NAIT-Fälle deutlich reduziert werden (Kjeldsen-Kragh et al. 2008). Nach Killie ergeben sich dadurch 210 bis 230 zusätzliche Quality-adjusted life years bezogen auf 100000 Fälle. Außerdem könnten 1,7 Millionen Euro Gesundheitsausgaben eingespart werden (Killie et al. 2007). Diese Arbeiten gaben in Norwegen Anlass dazu, über die Aufnahme eines generellen NAIT-Screenings in das pränatale Management nachzudenken (Kjeldsen-Kragh et al. 2008).

Die generelle postnatale Bestimmung der Thrombozytenzahl im Blut des Neugeborenen könnte unserer Meinung nach dazu beitragen, klinisch asymptomatische Thrombozytopenien aufzudecken und dann entsprechende Diagnostik zur Abklärung der Ursache anzuschließen. Im Falle einer NAIT als Grund für die Thrombozytopenie könnte bei einer möglichen Folgeschwangerschaft frühzeitig gezielte Diagnostik und gegebenenfalls Therapie eingeleitet werden. Vermutlich könnte dadurch das Risiko schwerwiegender NAIT-Komplikationen in folgenden Schwangerschaften gesenkt werden.

## **5.2 *Beeinflussung des Schwangerschaftsverlaufs durch Alloantikörper***

Die Beurteilung des Schwangerschaftsverlaufs erfolgte durch retrospektive Befragung der behandelnden Gynäkologen. Für die statistische Auswertung wurden die Ereignisse „Lebendgeburt“ bzw. „Abort“ als Endpunkte gewählt, wobei unter „Abort“ sowohl Früh- und Spätaborte als auch Totgeburten zusammengefasst wurden. Hieraus ergab sich für die untersuchte Kohorte eine Abortrate von 8,7% (n=9). In der gynäkologischen Praxis geht man von einer Abortrate zwischen 15% und 20% bezogen auf alle klinisch erkannten Schwangerschaften aus (Warburton und Fraser 1964).

Zwei der im Rahmen der Studie beobachteten Neugeborenen kamen mit einem VSD zur Welt. Klinische Zeichen im Sinne eines schweren MHN oder einer massiven

NAIT wurden bei keinem Kind festgestellt. Einschränkend muss jedoch gesagt werden, dass die Aussagen zum Befinden der Neugeborenen gynäkologischen Arztbriefen entstammen. Eine detailliert retrospektive Befragung der betreuenden Pädiater erfolgte nicht. Nur im Falle des Nachweises von Alloantikörpern im mütterlichen Serum wurde postnatal das Krankenblatt des Neugeborenen ausgewertet (siehe Kapitel 5.6).

### **5.2.1 Beeinflussung des Schwangerschaftsverlaufs durch HLA-Antikörper**

Die durchgeführte Studie konnte keinen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von HLA-Antikörpern im mütterlichen Blut und der Abortrate finden. Die von Terasaki aufgestellte Hypothese, dass es einen Zusammenhang zwischen HLA-Antikörpern und kongenitalen Anomalien gibt (Terasaki et al. 1970), konnte nicht belegt werden. Auch Balasch konnte in seiner Studie aus dem Jahr 1981 keinen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von HLA-Antikörpern und gynäkologischen Komplikationen in der Schwangerschaft, Plazentagewicht sowie Geburtsgewicht des Kindes finden (Balasch et al. 1981).

Die Toleranz des mütterlichen Immunsystems gegenüber dem semi-allogenen Fetus während der Schwangerschaft ist und bleibt eine intensiv studierte Thematik. Die Expression von HLA-G, -E und -F und das gleichzeitige Fehlen von HLA-A, -B und -C auf den Trophoblastenzellen stellen dabei die elementaren Bausteine im „Schutzprogramm“ fetaler Zellen vor dem mütterlichen Immunsystem dar (Pöhlmann 2006). Einen sehr guten Überblick über die immunologischen Grundlagen im Rahmen der Plazentation gibt die Arbeit „Reproductive Immunology – an Update“ (Pöhlmann et al. 2006). Maternale HLA-Antikörper vom IgG-Typ können die Plazenta überqueren und, nach Bindung an entsprechende fetale Antigene, einen beschleunigten Abbau der betroffenen fetalen Zellen im retikuloendothelialen System bewirken. Nicht in jedem Fall lassen sich die besagten Antikörper im Nabelschnurblut nachweisen. King konnte in seiner Studie aus dem Jahre 1996 nur in acht von 60 Nabelschnurblutproben von Neugeborenen, deren Mütter gegen die fetalen HLA-Antigene alloimmunisiert waren, HLA-Antikörper nachweisen (King et al. 1996). Entweder gehörten die gebildeten maternalen Antikörper nicht zum Typ IgG und



waren somit nicht befähigt, die Plazenta zu überqueren, oder – eine Plazentaüberquerung vorausgesetzt – die Bindung an entsprechende fetale Antigene war bereits erfolgt. In diesen Fällen könnte die Zahl der HLA-Antikörper im Nabelschnurblut unter die Nachweisgrenze gesunken sein.

Es liegen keine wissenschaftlich gesicherten Daten vor, die einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten mütterlicher HLA-Antikörper und einem erhöhtem Abortrisiko bestätigen (Marzusch und Steck 1998 und Balasch 1981). Auch die aktuelle Studie konnte einen Zusammenhang nicht belegen. Manche Autoren begründen dies mit der reduzierten HLA-Expression auf fetalen Leukozyten (Puri et al. 1993). Andere gehen von einer Adsorption der mütterlichen HLA-Antikörper an HLA tragenden Zellen im Stroma der Chorionzotten aus (Marzusch und Steck 1998). Eblen et al. nehmen blockierende Antikörper als Ursache an (Eblen et al. 2000). Hierbei handelt es sich um in der Schwangerschaft gebildete, glykosilierte Antikörper, die keine Effektorfunktion haben, sondern fetale und plazentare Antigene kompetitiv blockieren. Der Angriff regulärer Alloantikörper soll dadurch verhindert werden (Tempfer 2000).

Eine mögliche Beziehung zwischen HLA-Alloantikörpern und neonataler Thrombozytopenie konnte in der aktuellen Studie nicht belegt werden. Einschränkend muss jedoch gesagt werden, dass die gewählte Methodik nicht geeignet war, um genaue Aussagen hierzu zu treffen. Dass keines der Neugeborenen ein schweres Blutungsereignis erlitt, ist sicher. Wie viele der Kinder jedoch eine klinisch nicht bemerkte Thrombozytopenie aufzeigten, hätte nur durch Blutbildkontrollen bei jedem Neugeborenem aufdeckt werden können. Diesem „invasiven“ Eingriff, „nur“ zu Studienzwecken, steht die Mehrzahl der Mütter ablehnend gegenüber. Ebenfalls war durch die freie Wahl des Geburtsortes (unter anderem im häuslichen Milieu) bzw. der Klinik eine routinemäßige Blutbildkontrolle postnatal nicht durchsetzbar.

In einer Untersuchung von King kam es bei Neugeborenen, deren Mütter zur Geburt HLA-Antikörper aufwiesen, nicht signifikant häufiger zu Thrombozytopenien, als bei Neugeborenen mit HLA-Antikörper negativen Müttern. In den Fällen, in denen HLA-Antikörper im Nabelschnurblut gefunden wurden, traten Thrombozytopenien ebenfalls nicht signifikant vermehrt auf (King et al. 1996). Taaning kam in ihrem Review „HLA Antibodies and Fetomaternal Alloimmune Thrombozytopenia: Myth or

Meaningful?“ zu demselben Schluss. Sie wertete fünf prospektive Studien aus, in denen die HLA-Alloimmunisierung der Mutter der neonatalen Alloimmunthrombozytopenie gegenübergestellt wurde. Vier dieser Studien konnten keinen Zusammenhang feststellen (Taaning 2000).

Unserer Meinung nach ist die neonatale Alloimmunthrombozytopenie durch HLA-Antikörper keineswegs ein seltenes Geschehen. Thude beschreibt eine NAIT durch Anti-HLA B27 Antikörper. Die initiale Thrombozytenzahl des Neugeborenen post partum lag bei  $150 \times 10^9/l$ . Am zweiten Lebenstag war sie auf  $70 \times 10^9/l$  gesunken. Außerdem fielen jetzt petechiale Hauterscheinungen auf. Sonographisch ergab sich kein Anhalt für ein intracranielles Blutungsereignis. Die anschließenden Blutbildkontrollen zeigten einen kontinuierlichen Anstieg der Thrombozytenzahl. Am 16. Lebenstag war der Normalbereich erreicht. Ein Infektgeschehen, Hepatosplenomegalie oder Hämangiome als mögliche Ursachen einer nicht-immunologischen neonatalen Thrombozytopenie konnten ausgeschlossen werden. Gleiches gilt für eine Autoimmunthrombozytopenie der Mutter bzw. für Arzneimittel assoziierte Thrombozytopenien. Die angeschlossenen serologischen Untersuchungen ergaben keinen Anhalt für maternale oder fetale HPA-Antikörper. In der Genotypisierung der Plättchenantigene zeigte sich eine feto-maternale Inkompatibilität für HPA 15. Mittels MAIPA konnten Anti-HPA 15 Antikörper im Serum der Mutter bzw. des Neugeborenen ausgeschlossen werden. Der auf der ELISA-Technik basierende HLA-Antikörper Suchtest ergab ein positives Ergebnis im mütterlichen Serum. Die Differenzierung zeigte Anti-HLA B27 Antikörper (Titer 1:8). Durch Typisierungsverfahren konnte nachgewiesen werden, dass der für HLA B27 heterozygote Vater dieses Antigen sowohl an das Neugeborene, als auch an dessen zuvor geborenen Bruder, vererbt hatte. Weiterführenden Untersuchungen bestätigten das Vorliegen von Anti-HLA B27 Antikörpern in der Zirkulation des Neugeborenen und bestätigten somit einmal mehr den Verdacht auf eine HLA-Antikörper vermittelte NAIT (Thude et al. 2006). Den verzögerten Abfall der Thrombozytenzahl (erst am zweiten Lebenstag) erklärt der Autor mit folgenden zwei Hypothesen: Man vermutet, dass das für die Elimination antikörperbeladener Plättchen verantwortliche Makrophagen-Monozytensystem durch den Geburtsvorgang hochreguliert wird. So kommt es postpartal kurzfristig zu einer Erhöhung der Abbaurate im retikuloendothelialen System. Andererseits besteht der Verdacht, dass der

Geburtsstress eine kurzfristige Zunahme der neonatalen Thrombozytenzahl auslöst (Thude et al. 2006). In einem Casereport von Schleussner wird der Fall einer Schwangeren beschrieben, welche nach unkomplizierter erster Schwangerschaft beide Kinder der nachfolgenden zwei Schwangerschaften aufgrund schwerer Thrombozytopenien verlor. Die serologische Diagnostik zeigte einen Anti-HLA B7 Antikörper (Titer 1:512) im maternalen Serum. HPA-Antikörper wurden nicht nachgewiesen. Durch Genotypisierung wurde sowohl beim Vater als auch beim erstgeborenen Kind HLA B7 nachgewiesen. Nach Eintritt der vierten Schwangerschaft erfolgte eine Amniozentese. Auf den fetalen Zellen wurde ebenfalls HLA B7 gefunden. Der Titer, der im Fruchtwasser nachgewiesenen Anti-HLA B7 Antikörper, betrug 1:32. Daraufhin entschloss man sich zur Einleitung einer immunadsorbiven Therapie, welche drei Mal wöchentlich durchgeführt wurde. In SSW 34 wurde mittels primärer Sectio caesarea ein eutrophes Kind entbunden. Das Blutbild des Neugeborenen zeigte eine milde Thrombozytopenie, welche sich nach kurzfristiger Immunglobulingabe normalisierte. Dieses Fallbeispiel ist das erste, das die erfolgreiche pränatale Therapie einer NAIT durch HLA B7 demonstriert (Schleussner et al. 2009). Starcevic berichtet von einer 23-jährigen Erstgravida, bei deren Kind am zweiten Lebenstag im Rahmen einer Routineblutentnahme eine Thrombozytenzahl von  $19 \times 10^9/l$  entdeckt wurde. Nicht-immunologische Ursachen der Thrombozytopenie konnten ausgeschlossen werden. Die angeschlossene serologische Diagnostik sowie die Genotypisierung zeigten Anti-HLA A24 Antikörper im Serum von Mutter und Kind, wobei letzteres das entsprechende Antigen von Vater geerbt hatte. Die Thrombozytenzahl stieg auch in diesem Fall ab dem zweiten Lebenstag kontinuierlich an und erreichte nach zwei Wochen den Normbereich. Auffällig war eine diskrete Leukozytopenie ( $5,8 \times 10^9/l$  am dritten Lebenstag,  $5,3 \times 10^9/l$  am fünften Tag) mit einer milden Neutropenie (1400-1500 Neutrophile/mm<sup>3</sup>). Auch hierfür sind mit hoher Wahrscheinlichkeit die Anti-HLA A24 Antikörper verantwortlich (Starcevic et al. 2009). In Zusammenschau dieser Befunde sind HLA-Antikörper als mögliche Ursache einer NAIT nicht von der Hand zu weisen. Dass einige Autoren in ihren Reviews (z.B. Taaning 2000) keinen Zusammenhang zwischen HLA-Alloimmunisierung und NAIT finden, kann durch die niedrige Inzidenz der NAIT gegenüber der hohen Inzidenz der HLA-Antikörperbildung in der Schwangerschaft (7-39% nach Taaning 2000) bedingt sein (Starcevic et al. 2009).

### **5.2.2 Beeinflussung des Schwangerschaftsverlaufs durch thrombozytäre Antikörper**

Nicht jeder feto-maternale Mismatch im Bereich des HPA-Systems führt zur NAIT. Nach Schulmann ist mit einem NAIT-Fall auf 20-40 feto-maternale HPA-Inkompatibilitäten zu rechnen (Schulmann et al. 1964). Von den vier Frauen der aktuellen Studie, in deren Seren thrombozytäre Antikörper gefunden wurden, gebaren drei klinisch unauffällige Kinder. Entweder konnten die gebildeten Antikörper aufgrund ihres Immunglobulintyps die Plazenta nicht passieren und so nicht in die fetalen Zirkulation übertreten, oder es kam – ähnlich wie im Kapitel 5.2.1 für HLA-Antikörper beschrieben – zur Bindung der Antikörper an unspezifische Oberflächenstrukturen. Zudem muss bedacht werden, dass trotz klinisch unauffälligem Kind eine NAIT vorliegen kann. Asymptomatisch verlaufende Thrombozytopenien hätten nur durch entsprechende Blutbildkontrollen erfasst werden können.

Die in der jetzigen Studie nachgewiesenen HPA-Antikörper waren in drei Fällen gegen HPA 5b und in einem Fall gegen HPA 1a gerichtet. Drei der vier betroffenen Frauen beendeten die Schwangerschaft mit einer Lebendgeburt. Postpartal wurde bei keinem der Kinder eine Blutbildkontrolle durchgeführt, sodass eine Beurteilung der Thrombozytenzahlen nicht möglich war (zum Titerverlauf bzw. Status der Neugeborenen siehe Kapitel 5.5 und 5.6).

Bei einer der vier Patientinnen kam es zum Frühabort. In ihrem Serum konnten Anti-HPA 5b Antikörper (Titer 1:64) nachgewiesen werden. Ghevaert beobachtete in einer Studie aus dem Jahr 2007 fünf Aborte in einer Gruppe von 123 Schwangeren mit Thrombozytenantikörpern. Hierbei handelte es sich in drei Fällen um Anti-HPA 1a Antikörper. Einmal lagen Anti-HPA 1a und Anti-HPA 5b gleichzeitig vor, im fünften Fall wurde Anti-HPA 15b gefunden (Ghevaert et al. 2007).

In einer Untersuchung von Mueller-Eckhardt et al. kam es bei 12 von 88 Kindern mit NAIT zu intrakraniellen Blutungen (14%), wobei es sich bei 11 dieser Kinder um intrazerebrale Blutungen handelte. Bei fünf dieser 11 Kinder trat das Blutungsereignis bereits in utero auf (Mueller-Eckhardt et al. 1989). Zu intrakraniellen Blutungen im Rahmen der NAIT kann es ab der 16. SSW kommen, die Mehrzahl der Fälle tritt jedoch zwischen der 35. und 37. SSW auf (Singh et al. 2005). Hierzu sei

angemerkt, dass meist das Parenchym betroffen ist. Hirnblutungen aufgrund von Frühgeburtlichkeit betreffen dagegen meist das Ventrikelsystem (Naidu et al. 1983).

### **5.2.3 Beeinflussung des Schwangerschaftsverlaufs durch gleichzeitiges Vorliegen von Thrombozyten- und HLA-Antikörpern**

Ein Signifikanztest, der den Zusammenhang zwischen gleichzeitigem Vorliegen von HLA- und HPA-Alloantikörpern und einer erhöhten Abortrate untersucht, wurde aufgrund der niedrigen Fallzahl (n=3) nicht durchgeführt.

Bei einer der drei Frauen kam es zum Abort (Probandin #89, siehe auch Kapitel 5.4.2 sowie 5.5.3). Die zwei weiteren Schwangerschaften verliefen unauffällig.

Veröffentlichte Fallberichte, in denen das gleichzeitige Vorliegen HLA- und HPA-Antikörpern klinisch relevante Auswirkungen hatte, sind rar. Marín berichtet von einem Kind mit neonataler Alloimmunneutropenie und –thrombozytopenie und macht dafür im mütterlichen Serum nachgewiesene Anti-HNA 1a, Anti-HPA 3b, Anti-HLA A3 und Anti-HLA B38 Antikörper verantwortlich (Marín et al. 2005).

## **5.3 Häufigkeit von Thrombozyten- und HLA-Alloantikörpern in Abhängigkeit von der Zahl vorhergehender Schwangerschaften**

Mit jeder Schwangerschaft und Geburt steigt das Risiko, dass das mütterliche Immunsystem mit „fremden“, fetalen Antigenen in Kontakt kommt. Im Folgenden wird dieses Risiko getrennt für HLA- und HPA-Antigene diskutiert.

### **5.3.1 HLA-Antikörper in Abhängigkeit von der Zahl vorhergehender Schwangerschaften**

Die Untersuchung der 103 Probandinnen unter Beachtung ihrer Schwangerschaftsanamnese ergab, dass Primagravidae signifikant seltener HLA-Antikörper aufweisen, als Frauen mit Vor-Schwangerschaften. Zu diesem Ergebnis kam auch Terasaki. Er untersuchte das Auftreten von HLA-Antikörpern in aufeinanderfolgenden Schwangerschaften von 574 Frauen. Dabei fand er in der

zweiten Schwangerschaft bei einem Viertel der Probandinnen HLA-Antikörper, in der sechsten Schwangerschaft sogar bei der Hälfte der Frauen (Terasaki 1970). In einer Arbeit aus dem Jahr 1964 fand Terasaki bei 50% der Frauen mit vier oder mehr vorhergehenden Schwangerschaften HLA-Antikörper (Terasaki 1964). Dies stimmt mit unseren Ergebnissen überein. Hier konnten bei 53% (n=8) der Multigravidae Antikörper gegen HLA nachgewiesen werden. Payne und van Rood et al. konnten diese dagegen nur bei 6% bis 24% der Multigravidae finden (Payne 1962 und van Rood et al. 1959).

Die Frage, warum in 47% (n=7) der Serien der Frauen mit drei oder mehr Vor-Schwangerschaften keine Antikörper zu finden waren, kann nicht abschließend beantwortet werden. Möglicherweise kam es nie zum Kontakt mit fetalen Antigenen und demzufolge auch nicht zur Immunisierung der Mutter. An dieser Stelle sei auf die Artikel von Puri (Puri et al. 1993) und Marzusch (Marzusch und Steck 1998) verwiesen. Andererseits könnte es im Falle einer Immunisierung zum vollständigen Übertritt maternaler Alloantikörper über die Plazenta gekommen sein. Auch dann können im maternalen Serum keine Antikörper gefunden werden. Tragen Mutter und Vater die gleichen Antigene, so ist eine Antikörperbildung ebenfalls ausgeschlossen. Bezogen auf das HLA-System ist dieser Fall jedoch nahezu unmöglich. Bei Betrachtung der thrombozytären Antigene und deren Phänotypfrequenzen ist es dagegen nicht unwahrscheinlich, dass beide Elternteile dasselbe Antigenmuster tragen.

Unter den 20 HLA-Antikörper positiven Frauen der untersuchten Kohorte war eine Primagravida (#23), das heißt hier wurden Antikörper bereits in der ersten Schwangerschaft gefunden. Der Titer des HLA Klasse I Antikörpers blieb im Verlauf der Schwangerschaft auf niedrigem Niveau konstant. Die Bestätigung einer durch feto-maternale Inkompatibilität ausgelösten Antikörperbildung kann jedoch nur durch Antikörper Differenzierung, HLA-Typisierung von Mutter, Vater und Kind sowie durch positiven Crossmatch zwischen maternalem Serum und paternalen Lymphozyten gesichert werden. Dass die Bildung von HLA-Antikörpern bereits in der ersten Schwangerschaft möglich ist, zeigten auch Falk et al. in ihrer Studie aus dem Jahr 1993. Die Untersuchung im ersten Trimenon zeigte bei keiner Primagravida HLA-Antikörper. Im weiteren Verlauf der Schwangerschaft bildeten 30% von ihnen HLA-Alloantikörper aus und reagierten im Crossmatch mit paternalen Lymphozyten positiv

(Falk et al. 1993). Bei Probandin #23 fiel der Antikörpersuchtest bereits in der zehnten Schwangerschaftswoche positiv aus. Im LABScreen® HLA Klasse I Single wurden Anti-HLA A23, A24, A25, A32, B13, B57, B59, B63, B38 Antikörper nachgewiesen. Da die klassischen HLA Klasse I Antigene nicht auf den Trophoblastenzellen exprimiert werden (Marzusch und Steck 1998), muss es zum direkten Kontakt des maternalen Immunsystems mit fetalen Zellen gekommen sein (eine Transplantation oder Transfusion hatte nicht stattgefunden).

### **5.3.2 thrombozytäre Antikörper in Abhängigkeit von der Zahl vorhergehender Schwangerschaften**

In der beobachteten Kohorte konnten HPA-Antikörper signifikant häufiger bei Multigravidae nachgewiesen werden, als bei Primagravidae und Frauen mit ein oder zwei vorhergehenden Schwangerschaften. Ob diese Antikörper erst in der aktuellen Schwangerschaft gebildet wurden oder aus früheren Schwangerschaften stammen, kann nicht geklärt werden. Aussagen hierzu sind nur durch zusätzliche HPA-Typisierung mütterlicher- und väterlicherseits sowie der bereits geborenen Kinder und des Neugeborenen möglich. Bekanntlich tritt die Hälfte aller neonatalen Alloimmunthrombozytopenien bereits in der ersten Schwangerschaft auf (Fontana 2009). Daher ist es nicht unwahrscheinlich, dass die Antikörper der vier Anti-HPA positiven Frauen früheren Schwangerschaften entstammen. Drei Probandinnen dieser Gruppe waren mindestens dreimal zuvor schwanger, eine Probandin hat zwei Vor-Schwangerschaften in ihrer Anamnese.

Keine der vier Schwangeren hat angegeben, jemals Thrombozytenkonzentrate erhalten zu haben. Die nachgewiesenen HPA-Antikörper sind somit nicht durch eine substitutionsbedingte Alloimmunisierung zu erklären.

### **5.4 Häufigkeit von Thrombozyten- und HLA-Alloantikörpern in Abhängigkeit von der Zahl vorhergehender Aborte**

Zu rezidivierenden Aborten kommt es bei 0,5% bis 2% aller Frauen im reproduktionsfähigen Alter (Tempfer et al. 2000). In der aktuell untersuchten Kohorte

hatten 3% der Schwangeren habituelle Aborte. Eine gestörte Immuntoleranz durch feto-maternale Inkompatibilität ist nur eine von vielen möglichen Ursachen hierfür. Habituellen Frühaborten liegen oft Chromosomen- oder Trophoblastendefekte zugrunde. Spätaborte werden dagegen oft durch Infektionen oder genitale Fehlbildungen ausgelöst. Daneben können auch Endokrinopathien oder Fehler im Hämostasesystem eine Ursache sein (Bühling und Friedmann 2004). In 50% der Fälle kann trotz intensiver Diagnostik keine Ursache festgestellt werden (American College of Obstetricians and Gynecologists 1995).

Vorrausgegangene Aborte erhöhen das Risiko für erneute Aborte. Stirrat fand 1990 heraus, dass Frauen mit zwei aufeinanderfolgenden Aborten mit einer Wahrscheinlichkeit von 17% bis 35% einen dritten Abort erleiden. Für Frauen mit drei oder mehr früheren Fehlgeburten beträgt das Wiederholungsrisiko 25% bis 46% (Stirrat 1990).

#### **5.4.1 HLA-Antikörper in Abhängigkeit von der Zahl vorhergehender Aborte**

In der aktuellen Arbeit konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Nachweis von HLA-Antikörpern und der Zahl vorhergehender Aborte gefunden werden. Bei 67% (n=2) der Frauen mit habituellen Aborten wurden HLA-Antikörper nachgewiesen. Alle Schwangeren mit drei oder mehr früheren Aborten gebaren klinisch unauffällige Kinder.

Auch Falk stellte keine signifikanten Unterschiede der Antikörperhäufigkeit in Abhängigkeit früherer Aborte fest. Er fand am Ende der Schwangerschaft bei 30% der Frauen mit habitueller Abortneigung einen positiven Crossmatch mit paternalen Lymphozyten. In der Gruppe der Primagravidae ohne Abortanamnese trat dieses Ereignis genauso häufig auf (Falk et al. 1993). Unter Einbezug ähnlicher Arbeiten kommt die Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) in ihrer Leitlinie „Diagnostik und Therapie beim wiederholtem Spontanabort“ zu dem Schluss, dass eine „aufwendige“ Diagnostik hinsichtlich immunologischer Ursachen habitueller Aborte derzeit nicht gerechtfertigt ist. Die Untersuchung alloimmunologischer Faktoren wird nur unter Studienbedingungen als sinnvoll erachtet (AWMF 015/050).



Entgegen der in früheren Jahren weit verbreiteten Annahme, dass HLA-Antikörper in der Schwangerschaft negative Auswirkungen auf den Fetus haben, gehen heute zunehmend mehr Forschungsgruppen von einem positiven Einfluss der gegen paternale Lymphozyten gerichteten mütterlichen Alloantikörper aus (Tempfer 2000). Orgad zeigte, dass das Vorliegen von HLA-Antikörpern gegen väterliche HLA-Antigene (primär im maternalen Serum gebildet oder sekundär durch Gabe paternalen Lymphozyten induziert) die Wahrscheinlichkeit einer Lebendgeburt für eine Frau mit habituellen Aborten erhöht (Orgad 1999). Nachdem auch eine Metaanalyse von Porter et al. 2006 den Nutzen der paternalen Immuntherapie belegte (Porter et al. 2006), spricht sich die Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften in speziellen Fällen für eine immunmodulatorische Therapie aus (AWMF 015/050).

#### **5.4.2 thrombozytäre Antikörper in Abhängigkeit von der Zahl vorhergehender Aborte**

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Nachweis thrombozytärer Antikörper und der Anzahl vorhergehender Aborte konnte nicht festgestellt werden. Zwei interessante Fallbeispiele aus der untersuchten Kohorte sollen an dieser Stelle aufgeführt werden. Bei der ersten Probandin (#42) handelt es sich um eine 32-jährige Frau mit drei früheren Schwangerschaften, welche alle mit einem Abort (ein Spätabort, zwei Frühaborte) endeten. In der Abortsprechstunde wurden folgende Befunde erhoben: Toxoplasmose negativ, Chlamydien negativ, Faktor V Mutation negativ, Homocystein im Referenzbereich, Prothrombinmutation negativ, Blutgruppe 0 Rh<sup>+</sup>, Vorliegen eines Uterus arcuatus et myomatosus. Durch Zufall nahm diese Frau an der aktuellen Studie teil. Bereits in der 8. SSW wurden im MAIPA Anti-HPA 1a Antikörper nachgewiesen (Titerverlauf siehe 4.5). Eine Übernahme in das transfusionsmedizinische Zentrum des Universitätsklinikums Jena wurde von der Patientin abgelehnt. In der 12. SSW erfolgte die Anlage einer prophylaktischen Frühcerclage, worunter in der 14. SSW Schmierblutungen auftraten. Zur Verbesserung der Plazentaperfusion erhielt die Schwangere bis zur 35. SSW Acetylsalicylsäure. Außerdem wurden Progesteron und Magnesium (bis SSW 36) substituiert. Ab SSW 36 stagnierte das fetale Wachstum. Mittels Sectio caesarea

wurde in SSW 40 ein 2650g schweres und 50cm langes Mädchen entbunden (APGAR 9/9/10). Die Plazenta war mit 330g untergewichtig. Sie zeigte viel intervillöses Fibrin sowie kleinere, ältere Infarkte als Ausdruck einer Durchblutungsstörung. Der klinische Befund des Neugeborenen war unauffällig. Es zeigten sich keine Petechien. Der neurologische Status war orientierend unauffällig. Sehr interessant wäre die Thrombozytenzahl im Blut des Neugeborenen gewesen. Leider wird diese nicht routinemäßig kontrolliert. Im genannten Fallbeispiel konnte die Ursache für die wiederholten Aborte nicht ermittelt werden. Eine alloimmunologische Genese im Sinne einer FNAIT kann nicht ausgeschlossen werden.

Das zweite Beispiel betrifft eine 42-jährige Frau (#89) mit vier vorhergehenden Schwangerschaften, von denen drei mit der Geburt klinisch unauffälliger Kinder endeten. Eine Schwangerschaft wurde abgebrochen (Indikation nicht bekannt). In der aktuellen Serumprobe der Frau aus SSW 7 konnten neben niedrig titrigen HLA-Antikörpern auch Antikörper gegen HPA 5b nachgewiesen werden. Im Verlauf der Früh-Schwangerschaft kam es zum Abort. Die HPA-Typisierung der Mutter, des Vaters und der drei Kinder sowie die Recherche der Interruptionsindikation (falls medizinisch gestellt) könnten in diesem Fall helfen, eine NAIT als mögliche Abortursache zu identifizieren.

## **5.5 Diskussion ausgewählter Titerverläufe**

Der große Abstand zwischen den einzelnen Probenentnahmen sowie der geringe Kohortenumfang erlauben keine statistische Auswertung der Titerverläufe. Im Folgenden sollen einige Fallbeispiele diskutiert werden.

Eine vollständige Abhandlung der immunologischen Grundlagen der Plazentation würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Es sei daher an dieser Stelle auf aktuelle Literatur verwiesen.

### **5.5.1 Anstieg des Antikörpertiters im Verlauf der Schwangerschaft**

Sowohl Probandin #10, als auch Probandin #19 hatten bereits eine Schwangerschaft zuvor. Beide beendeten sie mit einer Lebendgeburt. In SSW neun bzw. sechs der

jetzigen Schwangerschaft wurden bei ihnen HLA-Antikörper nachweisen, deren Titer – bestimmt mittels ELISA – im Verlauf auf 1:1024 (#10) bzw. 1:2048 (#19) anstieg. Alle zwei Frauen gebaren klinisch unauffällige Kinder. Eine Immunisierung in der ersten Schwangerschaft kann nicht ausgeschlossen werden. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist es jedoch auch in der aktuellen Schwangerschaft zum Kontakt des mütterlichen Immunsystems mit fetalen Antigenen gekommen, wodurch entweder die Boosterung präformierter Antikörper bzw. deren erstmalige Bildung ausgelöst wurde.

Im Abschnitt „Beeinflussung des Schwangerschaftsverlaufs durch HLA-Antikörper“ wurden bereits Hypothesen aufgeführt, welche die fehlende schädigende Wirkung der plazentagängigen Antikörper gegenüber den fetalen Zellen – und somit die klinisch unauffälligen Neugeborenen der zwei beschriebenen Frauen – erklären können. In-vitro Experimente zeigten, dass mit Hilfe des Zytokins IFN- $\gamma$  die Expression von HLA Klasse I Antigenen auf Trophoblastenzellen ausgelöst werden kann (Feinman et al. 1987). Man vermutet, dass auch in-vivo auf diesem Weg fetale Antigene dem maternalen Immunsystem präsentiert werden können. Dies könnte eine Erklärung hoher Antikörpertiter im Serum der Mutter sein. Es stellt sich jedoch die Frage, was eine derartige Antigen-Antikörper-Reaktion im Bereich des Trophoblasten für Folgen mit sich bringt. Zu denken ist an eine Abstoßungsreaktion im Sinne eines Abortes (Marzusch und Steck 1998). Andererseits wird dem durch die Blastocyste produziertem IFN- $\gamma$  eine große Bedeutung bei den Implantationsvorgängen, bei der Expression von HLA-G sowie bei der viralen Abwehr des Feten zugeschrieben (Pöhlmann 2006). Die Rolle bei der Präsentation fetaler Antigene in-vivo bleibt also offen.

### **5.5.2 Abfall des Antikörpertiters im Verlauf der Schwangerschaft**

Im Fall von Probandin #56 fiel der Titer (1:16) der bei ihr in SSW 13 erstmals nachgewiesenen HLA Klasse I Antikörper (Anti-HLA B56, B63, B50, B72, B62, B49, B71 und B46) im Verlauf der Schwangerschaft unter die Nachweisgrenze. Diese Frau hatte bereits drei frühere Schwangerschaften (eine Geburt, ein Abort und eine Interruptio). Die aktuelle Schwangerschaft wurde mit einer Lebendgeburt beendet.

Um Aussagen dahingehend treffen zu können, ob die Antikörperbildung durch die jetzige Schwangerschaft ausgelöst wurde, wäre eine HLA-Typisierung des Neugeborenen, des Vaters sowie des Geschwisters nötig. Nimmt man an, dass in der aktuell beobachteten Schwangerschaft eine feto-maternale HLA-Inkompatibilität mit Antikörperbildung vorlag, stellt sich die Frage, warum der Titer im Schwangerschaftsverlauf abnahm. Möglich ist ein Übertritt von mütterlichen IgG-Antikörpern in die fetale Zirkulation. Um diesen Sachverhalt abzuklären, hätte man die serologischen Untersuchungen zusätzlich im fetalen Blut bzw. im Fruchtwasser durchführen müssen.

Gleiches gilt für den Fall von Probandin #42 (siehe 5.4.2), bei der ein Anti-HPA 1a Antikörper nachgewiesen wurde. Ob die vorangehenden drei Aborte der Probandin mit diesem HPA-Antikörper in Verbindung stehen, kann nur gemutmaßt werden. Pathologische Untersuchungen des Abortmaterials bei einem Spätabort in der 18. SSW gaben keinen Hinweis auf ein Blutungsgeschehen. Letztendlich können auch hier nur genetische Untersuchungen weiterhelfen.

### **5.5.3 Zeitpunkt des erstmaligen Antikörpernachweises**

In den meisten Fällen mit positivem HLA- oder HPA-Antikörpernachweis zeigte bereits der erste Antikörpersuchtest zu Beginn der Schwangerschaft ein positives Ergebnis. Bei Probandin #43, einer 28-jährigen Frau mit zwei früheren Geburten (beide Neugeborenen klinisch unauffällig), wurden jedoch erst in SSW 24 HLA Klasse I Antikörper (Titer 1:64) nachgewiesen. Die Untersuchung einer Serumprobe aus SSW 31 ergab einen Titer von 1:32. Zu diesem Zeitpunkt wurde zusätzlich ein gegen HPA 5b gerichteter, thrombozytärer Antikörper entdeckt. Die Entbindung des als lebensfrisch, reif und mit rosigem Hautkolorit beschriebenen Kindes erfolgte in SSW 39. Mittels HPA-Typisierung der Mutter, des Kindes sowie des Vaters wären Aussagen zu den vorliegenden HPA möglich. Angenommen, das Kind ist Träger von HPA 5b, so ist es vermutlich erst im Verlauf der aktuellen Schwangerschaft zum Kontakt des mütterlichen Abwehrsystems mit fetalen Antigenen gekommen. Die Ursachen hierfür sind unklar. Invasive pränatale Diagnostik wurde nicht durchgeführt. Möglich wäre auch ein Trauma, bei dem es durch Verletzung der Plazentaschranke zum Übertritt fetaler Zellen in den intervillösen Raum kam. Schwerwiegende

Traumata wurden bei der retrospektiven Befragung des betreuenden Gynäkologen nicht berichtet. Pathologische Prozesse im Bereich der Plazenta, wie zum Beispiel Infarkte oder Thrombosen, könnten ebenfalls dafür verantwortlich gewesen sein, dass fetale Zellen in den mütterlichen Blutkreislauf eingeschwemmt wurden (Bühling und Friedmann 2004). Nach Proulx ist der Titer des HPA-Antikörpers im mütterlichen Serum nicht geeignet, das Auftreten oder die Schwere einer NAIT vorherzusagen (Proulx et al. 1994). Zu demselben Schluss kommt auch Kurz (Kurz et al. 1999).

Es kann nur gemutmaßt werden, ob der Anti-HPA 5b Antikörper im Serum von Probandin #89 aus SSW 7 mit einem Titer von 1:64 kausal mit dem Früh-Abort in Zusammenhang steht. Neben den bereits erwähnten genetischen Untersuchungen bei Mutter, Fetus und Vater wäre der Antikörpertiter im fetalen Blut bzw. im Fruchtwasser von Bedeutung. Gleiches gilt für den Fall von Probandin #109. Hier betrug der Titer des Anti-HPA 5b Antikörpers im mütterlichen Serum zu allen drei Untersuchungspunkten 1:128. Im Rahmen einer Hausgeburt erfolgte die Entbindung eines klinisch nicht auffälligen Kindes. Postnatale Labordiagnostik wurde nicht durchgeführt.

### ***5.6 Status der Neugeborenen von Müttern mit HLA- bzw. HPA-Antikörpern***

Von den insgesamt 21 Probandinnen mit HLA- bzw. HPA-Antikörpern im Serum standen nur in fünf Fällen Blutbilder der Neugeborenen zur Auswertung zur Verfügung. Bei keiner der drei Frauen mit positivem HPA-Antikörperstatus lagen Blutbildkontrollen der Kinder vor. Statistische Aussagen bzgl. möglicher Leuko- bzw. Thrombozytopenien bei Kindern, deren Mütter entsprechende Antikörper gebildet hatten, sind daher nicht möglich. Hierfür hätte man – um methodisch korrekt vorzugehen – bei jedem Neugeborene der 103 teilnehmenden Probandinnen eine Blutbildkontrolle postnatal durchführen müssen. Nur so wäre es möglich gewesen, Aussagen dazu zu treffen, ob es bei den Kindern von Müttern mit HLA- und HPA-Antikörpern häufiger zu Blutbildveränderungen kommt.

Die Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) zur „Betreuung des gesunden Neugeborenen im

Kreißsaal und während des Wochenbettes der Mutter“ sieht, „abgesehen von der obligatorischen Kontrolle des Säure-Basen-Status im Blut der Nabelarterie“ und des Screenings auf angeborene Stoffwechselerkrankungen, keine weiteren Blutuntersuchungen vor (AWMF 024/005). Nur bei klinisch auffälligen Kindern wird nach Indikationsprüfung eine Blutbildkontrolle durchgeführt. In dem von Nomura beschriebenen Beispiel fiel ein Neugeborenes am zweiten Lebenstag durch Petechien und retinale Blutungen auf. In dem daraufhin veranlassten Blutbild zeigte sich eine deutlich erniedrigte Thrombozytenzahl von  $68 \times 10^9/l$ . Die Kontrolle am dritten Lebenstag ergab einen weiteren Abfall auf  $42 \times 10^9/l$ . Im kranialen Ultraschall zeigten sich glücklicherweise keine Blutungshinweise. Im weiteren Verlauf stiegen die Thrombozyten schrittweise wieder an, sodass am fünften Lebenstag die Entlassung erfolgen konnte. Die angeschlossene Genotypisierung des HPA-Musters ergab eine Inkompatibilität bzgl. HPA 5 und HPA 15. Es konnten jedoch sowohl durchflusszytometrisch, als auch mittels MAIPA keine HPA-Antikörper im mütterlichen Serum gefunden werden (Nomura et al. 2010). Dies schließt eine NAIT jedoch nicht aus. In den Untersuchungen von Kjeldsen-Kragh et al. konnten HPA-Antikörper stellenweise erst mehrere Wochen nach der Geburt nachgewiesen werden (Kjeldsen-Kragh et al. 2007). Im Fallbeispiel von Nomura et al. wurden erst in der 11. SSW der folgenden Schwangerschaft Anti-HPA 5b Antikörper nachgewiesen. Da sich in der Genotypisierung des Ungeborenen kein Anhalt für HPA-5b ergab, war nicht mit einer NAIT durch Anti-HPA 5b Antikörper zu rechnen. Anders war dies jedoch in der dritten Schwangerschaft der beobachteten Frau: Hier ergab die Genotypisierung des ungeborenen Kindes einen positiven Antigenstatus für HPA-5b. Daraufhin begann man mit einer Immunglobulin- und Prednisolontherapie. Das schließlich in der 38. SSW geborene Kind zeigte sich klinisch unauffällig und hatte einen Thrombozyten Spiegel von  $280 \times 10^9/l$  (Nomura et al. 2010).

Obwohl die Rolle von HLA-Antikörpern als Ursache von NAIT noch immer kontrovers diskutiert wird, mehren sich Casereports, in denen genau diese Konstellation beschrieben wird. Es sei an dieser Stelle auf die Darstellungen von Thude (Thude 2006), Schleussner (Schleussner 2009) und del Rosario (del Rosario 1998) verwiesen. Bei der diskreten Thrombozytopenie des neugeborenen Kindes von Probandin #34 ist eine Ursache nicht auszumachen. Um herauszufinden, ob der nachgewiesene Anti-HLA 19 Antikörper dafür verantwortlich ist, wären

Genotypisierungen von Mutter, Vater und Neugeborenem sowie die Untersuchung des Fruchtwassers und des fetalen Blutes auf mögliche Antikörper bzw. deren Titer nötig. Gleiches gilt für das Kind von Probandin #60, bei dem postnatal eine Leukozytopenie (6,8GPT/l) und eine Thrombozytopenie (246GPT/l) festgestellt wurden. Inwieweit die im mütterlichen Serum pränatal nachgewiesenen HLA-Antikörper (Anti-HLA-A1 und Anti-HLA-DR7) hierbei eine Rolle spielen, kann mit den in dieser Arbeit angewandten Methoden nicht näher erörtert werden. Neonatale Leukozytopenien können bei verschiedensten hämatologischen Grunderkrankungen und Stoffwechselerkrankungen, wie zum Beispiel der Glykogenose Typ Ib, auftreten (Muntau 2007). Da sich das Blutbild des Kindes von #60 jedoch innerhalb weniger Tage postnatal normalisierte, sind derartige Ursachen unwahrscheinlich. In Frage kommt eher eine infektiöse Genese (zumal durch einen vorzeitigen Blasensprung eine Frühgeburt ausgelöst wurde). Die Gründe für neonatale Thrombozytopenien sind ebenso vielschichtig. Es sei an dieser Stelle auf die Ausarbeitung von Dame in dem Buch „Pädiatrische Hämatologie und Onkologie“ (Gadner et al. 2005) verwiesen. Auch im Rahmen einer Plazentainsuffizienz kann durch die Reduktion der Thrombozytenproduktion deren Spiegel erniedrigt sein (Roberts and Murray 2003). Bezogen auf den Fall #60 ist eine neonatale Infektion als Ursache recht wahrscheinlich.

Nach einer Arbeit von Ahya haben ein bis vier Prozent aller Neugeborenen zur Geburt Thrombozytenspiegel unter  $150 \times 10^9/l$ . Betrachtet man neonatologische Intensivstationen, sind 20-40% von einer Thrombozytopenie betroffen. Nach Ahya ist dabei die fetomaternalen Inkompatibilität mit nachfolgender Alloimmunisierung die Hauptursache aller schweren neonatalen Thrombozytopenien (Ahya et al. 2001). Klinische Symptome treten erst ab einer Thrombozytenzahl kleiner  $50 \times 10^9/l$  auf (Jhavar et al. 2003). Die meisten NAIT-Fälle verlaufen asymptomatisch (Nomura et al. 2010). Die Wiederholungsrate in folgenden Schwangerschaften beträgt laut Arnold ca. 90%, wobei mit schwereren Verläufen gerechnet werden muss (Arnold et al. 2008). In Zusammenschau dieser Aspekte könnte eine routinemäßige Blutbildkontrolle bei Neugeborenen helfen, klinisch ansonsten asymptomatische NAIT-Fälle herauszufinden. Bei nachgewiesener neonataler Thrombozytopenie sollte eine weiterführende NAIT-Diagnostik angeschlossen werden. Auf diesem Weg

könnten – möglicherweise gravierender verlaufende – Alloimmunthrombozytopenien in Folgeschwangerschaften frühzeitig diagnostiziert und therapiert werden.

Anbieten würde sich eine nahezu schmerzlose und wenig Blutvolumen benötigende kapilläre Blutbildkontrolle bei jedem Neugeborenem. Kosten und Nutzen eines solchen Vorgehens sollten in klinischen Studien geprüft werden.

Ein direkter Coombstest, mit Hilfe dessen geprüft wird, ob die kindlichen Erythrozyten mit Antikörpern beladen sind, wurde bei neun der 17 betrachteten Kinder durchgeführt. In zwei Fällen lieferte dieser Test ein positives Ergebnis. Bei dem Kind von Probandin #6 ist ein Morbus haemolyticus neonatorum aufgrund von feto-maternaler AB0-Inkompatibilität dafür verantwortlich. Die mütterliche Blutgruppe wurde mit 0, die des Neugeborenen mit A angegeben. Ein Morbus haemolyticus neonatorum durch andere erythrozytäre Antikörper konnte durch negative Antikörper Suchtests im maternalem Serum ausgeschlossen werden. AB0-Erythroblastosen treten meist – wie auch im beschriebenen Beispiel – bei der Blutgruppenkonstellation „Mutter 0/Kind A oder B“ auf. Derartige Inkompatibilitäten bestehen nach Cariani in etwa 16% der Schwangerschaften. Zu hämolytischen Erkrankungen der Neugeborenen kommt es jedoch nur in 5% (Cariani et al. 1995). In der aktuellen Studie liegen in acht Fällen Informationen zu den kindlichen Blutgruppen vor. Feto-maternale AB0-Inkompatibilitäten bestehen dabei in drei Fällen, wobei zwei Mal die Konstellation „Mutter 0/Kind A“ und ein Mal die Konstellation „Mutter 0/Kind B“ besteht. Als Ursache dafür, dass nicht jede AB0-Inkompatibilität zu einem Morbus haemolyticus führt, wird die partielle Absorption der entsprechenden IgG-Antikörper an löslichen Plasmaantigenen und nichterythrozytären Geweben angenommen (Mueller-Eckhardt und Kiefel 2004). Probandin #6 war bereits vier Mal zuvor schwanger, wobei es drei Mal zum Abort in der Frühschwangerschaft kam. Die einzige Geburt war eine Forceps-Entbindung. Nach Angaben der Mutter war das Kind bis auf eine postnatale Tachykardie unauffällig. Von einem Ikterus wurde nicht berichtet. Wie bereits in der Einleitung dargestellt, kann es bereits in der ersten Schwangerschaft zu AB0-Erythroblastosen kommen. Das von einem Morbus haemolyticus betroffene Kind zeigte den – bei ursächlicher AB0-Inkompatibilität häufig vorkommenden – milden klinischen Verlauf mit diskreter Anämie und Ikterus. Nach Gadner kommt es nur in seltenen Fällen zur Hepatosplenomegalie und so gut wie nie zum Hydrops fetalis. Unreife Vorstufen der Erythrozyten können im



peripheren Blut der Kinder vermehrt zu finden sein (Gadner et al. 2005). Das neugeborene Mädchen von Probandin #6 zeigte normwertige Retikulozyten. Neben einem Infusionsprogramm wurde eine Fototherapie eingeleitet, worunter sich die Bilirubinwerte und der Ikterus innerhalb weniger Tage regredient zeigten. In den meisten Fällen einer AB0-Erythroblastose ist ein derartiges Vorgehen ausreichend. Nur 0,02 bis 0,03% aller Neugeborenen mit Morbus haemolyticus durch AB0-Inkompatibilität benötigen Austauschtransfusionen (Mueller-Eckhardt und Kiefel 2004).

Das positive Ergebnis des direkten Coombstests bei dem Neugeborenen von Probandin #87 lässt sich nur diskutieren, da weiterführende Untersuchungen fehlen. Alle drei Antikörper Suchtests bei der Mutter waren unauffällig, auch der zuletzt in SSW 35 durchgeführte. Nach der Geburt in SSW 37+6 durch Sectio caesarea fiel der direkte Coombstest beim Kind positiv aus. Eine AB0-Inkompatibilität kann aufgrund der Blutgruppenkonstellation (Mutter B, Kind 0) ausgeschlossen werden. Es besteht jedoch eine Inkompatibilität im Rhesus-System: Die Mutter war Rhesus negativ, die kindlichen Erythrozyten exprimierten das Antigen D auf ihrer Oberfläche. Eine Sensibilisierung bis zur 35. SSW konnte durch die Antikörper Suchteste im mütterlichen Serum ausgeschlossen werden. Eine nach der 35. SSW erfolgte Immunisierung ist prinzipiell möglich und könnte eine Anti-D Antikörperbildung ausgelöst haben. Nach transplazentarem Übertritt könnte so eine Bindung an kindliche D-Antigene erfolgt sein. Dagegen spricht jedoch die laut Krankenakte regelrecht durchgeführte präpartale Anti-D-Prophylaxe (genauer Zeitpunkt nicht bekannt). Durch diese sollten in die mütterliche Zirkulation übergetretene fetale Erythrozyten gebunden und so eine Immunisierung der Mutter vermieden werden. Ebenfalls gegen eine Rhesus-Erythroblastose spricht der klinische Status des Neugeborenen. Sowohl direkt postnatal als auch zur U2 am vierten Lebenstag wurde das Kind als lebensfrisch und mit rosigem Hautkolorit beurteilt. Im Falle eines Morbus haemolyticus neonatorum ist – deutlich häufiger als bei AB0-Erythroblastosen – mit einem Ikterus praecox (d.h. innerhalb der ersten 36 Lebensstunden) sowie mit einer höhergradigen Anämie, abgesehen von den kritischen Verläufen bis zum Hydrops fetalis, zu rechnen (Mueller-Eckhardt und Kiefel 2004). Wahrscheinlicher ist die Erklärung des positiven direkten Coombstests durch die präpartale Anti-D-Prophylaxe, in Rahmen derer injiziertes Anti-D Immunglobulin transplazentar mit

fetalen Erythrozyten in Kontakt kommen kann (Empfehlungen der Akademie für fetomaternalen Medizin (AFMM) 2006). Weshalb der indirekte Coombstest der Mutter jedoch keinen Anhalt für eine Anti-D Substitution gibt, kann nur vermutet werden. Wahrscheinlich erscheint eine vollständige Bindung an kompatible Antigenstrukturen. Die Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) zur Betreuung von gesunden Neugeborenen sehen die Durchführung eines direkten Coombstests nicht bei jedem Kind vor (AWMF 024/005). Selbstverständlich sollte dieser jedoch stets bei positivem Antikörper Suchtest im mütterlichen Serum, bei jeder Form des postnatalen Ikterus sowie bei kindlicher Anämie angeschlossen werden.

Aus den betrachteten 17 Krankenblättern geht hervor, dass es in drei Fällen zu einem Neugeborenenikterus kam. Hierbei ergab der direkte Coombstest in einem Fall (Kind von Probandin #6) ein positives Ergebnis. 60% aller Neugeborenen bilden in den ersten Lebenstagen einen Ikterus aus (Arlettaz et al. 2006, modifiziert durch Baumann 2010). Bezüglich möglicher Differentialdiagnosen des nicht durch Blutgruppeninkompatibilitäten verursachten Neugeborenenikterus sei auf entsprechende pädiatrische Literatur verwiesen.

## 6 Schlussfolgerungen

Auch nach Einführung der prä- und postpartalen Anti-D-Prophylaxe sind die in den Mutterschaftsrichtlinien verankerten, routinemäßig durchzuführenden Suchtests auf irreguläre erythrozytäre Antikörper weiterhin ein unabdingbares Element in der Schwangerschaftsvorsorge. Um einen, mit diesen Tests nicht zu diagnostizierenden, MHN durch ABO-Inkompatibilität nicht zu übersehen, sollte bei jeder Form der kindlichen Anämie bzw. bei neonatalem Ikterus ein direkter Coombstest angeschlossen werden. Durch rechtzeitiges Einleiten adäquater Therapie können die möglicherweise gravierenden Folgen eines MHN abgewendet werden.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass HPA- und HLA-Alloantikörper häufig im Serum schwangerer Frauen zu finden sind. Dabei erhöht die Zahl der vorhergehenden Schwangerschaften signifikant die Wahrscheinlichkeit, dass Antikörper nachgewiesen werden. Dass der Antikörperbildung eine feto-maternale Inkompatibilität zugrunde liegt, ist sehr wahrscheinlich, kann jedoch mit den angewandten Methoden nicht endgültig belegt werden.

Eine Erhöhung der Abortrate durch das Vorliegen von Alloantikörpern wurde nicht beobachtet. Unter Berücksichtigung der Fachliteratur darf jedoch das Risiko für schwerwiegende Komplikationen seitens des Kindes auf keinen Fall unterschätzt werden. Dies betrifft vor allem die gravierenden Folgen der neonatalen Alloimmunthrombozytopenie durch HPA- oder HLA-Antikörper, welche durch adäquate Diagnostik frühzeitiger erkannt und dann bereits pränatal mittels Immunadsorption suffizient behandelt werden könnte. Aus diesem Grund sollte der Stellenwert der Alloantikörperdiagnostik in der geburtshilflichen Praxis überdacht werden. Leider sind die Bestimmung der Thrombozytenzahl sowie die Untersuchung des Gerinnungsstatus bei Neugeborenen kein Standard in deutschen Kliniken. Um klinisch nicht auffällige neonatale Thrombozytopenien, die durchaus eine Erscheinungsform der NAIT sein können, in Zukunft aufdecken zu können, sollte die Thrombozytenzahl routinemäßig bei jedem Neugeborenen kontrolliert werden. Wird eine Thrombozytopenie festgestellt, muss, nach Ausschluss nicht-immunologischer Thrombozytopenieursachen, eine NAIT-Diagnostik inklusive Genotypisierung von Eltern und Kind angeschlossen werden. Neben der Bedeutung für die aktuelle Schwangerschaft ist die NAIT-Diagnostik auch für alle Folgeschwangerschaften von

enormer Relevanz, wenn es um die Vermeidung von Blutungsereignissen, ausgelöst durch präformierte feto-maternale Alloantikörper, geht. Ist es bei vorliegenden maternalen HPA-Alloantikörpern zum Eintritt einer erneuten Schwangerschaft gekommen, so sollte diese stets in einem perinatalmedizinischen Zentrum in Zusammenarbeit mit einem transfusionsmedizinischen Institut betreut werden.

Inwieweit ein Screeningprogramm – zum Beispiel im Sinne eines generellen HLA- und HPA-Antikörper Suchtests in der Schwangerschaft oder, in Anlehnung an die Studie von Killie (Killie 2007), als HPA-Typisierung – Vorteile bietet, sollte in speziell darauf ausgerichteten Studien untersucht werden. Frauen mit habituellen Aborten und alle, die in vorhergehenden Schwangerschaften Kinder mit klinischen Zeichen einer Thrombozytopenie gebären, sollten stets einer gründlichen NAIT-Diagnostik zugeführt werden.

Die in der Studie ermittelten Faktoren, die das Risiko der Alloantikörperbildung erhöhen, könnten in der Praxis für die bessere Erfassung besonders gefährdeter Schwangerschaften genutzt werden.

## 7 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Adamzik I, Jin J, Sachs V, Thomsen H. 1995. Vermeidung der HLA-Antikörper-Bildung bei Patienten mit hämato-onkologischen Erkrankungen durch Einsatz leukozytendepletierter Blutpräparate. Infusionsther Transfusionsmed, 22: 9-13.
- Ahya R, Turner ML, Urbaniak SJ; SNAIT Study Team. 2001. Fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. Transfus Apher Sci., 25(2):139-45.
- Aktualisierte Empfehlungen der Akademie feto-maternale Medizin (AFMM) vom 24. Juli 2005 in Lugano. 2006. Anti-D-Rhesusprophylaxe. Schweiz Med Forum, 6: 749-751.
- American College of Obstetricians and Gynecologists. 1995. Early Pregnancy Loss. ACOG technical bulletin, No. 212. Washington DC: American College of Obstetricians and Gynecologists.
- Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. 2004. Betreuung des gesunden Neugeborenen im Kreißsaal und während des Wochenbettes der Mutter. AWMF-Leitlinien Register Nr. 024/005.
- Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. 2006. Diagnostik und Therapie beim wiederholten Spontanabort. AWMF-Leitlinien Register Nr. 015/050.
- Arlettaz, Blumberg A, Buetti L, Fahnenstich H, Mieth D, Roth-Kleiner M. 2006. Modifiziert durch Baumann 2010. Ikterus - Revidierte Empfehlungen der Schweizerischen Gesellschaft für Neonatologie.
- Arnold DM, Smith JW, Kelton JG. 2008. Diagnosis and management of neonatal alloimmune thrombocytopenia. Transfus Med Rev, 22(4): 255–267.

- Balasch J, Ercilla G, Vanrell JA, Vives J, Gonzalez-Merlo J. 1981. Effects of HLA Antibodies on Pregnancy. *Obstetrics & Gynecology*, 57(4): 444-446.
- Beckmann MW, Dall P, Fasching P, Krüssel JS, Niederacher B, Tutschek B. 2002. *Molekulare Medizin in der Frauenheilkunde: Diagnostik und Therapie*. Erlangen und Düsseldorf. Steinkopff Verlag Darmstadt.
- Behrens O, Bader W, Holle W, Maas DH, Schneider J. 1993. Antikörper-Nachweis nach antepartaler Rhesus-Prophylaxe: Normalfall oder Sensibilisierung? *Geburtsh Frauenheilkd*, 53: 342-345.
- Behrens O, Schneider J. 2000. Diagnostik und Therapie des M. haemolyticus fetalis. *Der Gynäkologe*, 33 (11): 812-827.
- Bessos H, Seghatchian J. 2005. What's happening? The expanding role of apheresis platelet support in neonatal alloimmune thrombocytopenia: Current status and future trends. *Transfusion and Apheresis Science*, 33 (2): 191-197.
- Bowman JM, Pollock JM, Manning FA, Harman CR, Meticogolou S. 1992. Maternal Kell blood group alloimmunization. *Obstet Gynecol*, 79: 239-244.
- Bowman JM. 1997. The management of hemolytic disease in the fetus and newborn. *Semin Perinat* 21: 39-44.
- Bühling KJ, Friedmann W. 2004. *Intensivkurs Gynäkologie und Geburtshilfe*. 1. Aufl. München und Jena. Urban und Fischer Verlag.
- Bundesanzeiger. 2000. Bekanntmachung des Paul-Ehrlich-Instituts über die Ergebnisse des Stufenplanverfahrens zur Einführung der Leukozytendepletion von zellulären Blutprodukten zur Transfusion (vom 18. August 2000). *Bundesanzeiger Nr. 174 vom 14.09.2000*. Seite 18396.

- Bussel B, Zacharoulis S and Kramer K *et al.* 2005. Clinical and diagnostic comparison of neonatal alloimmune thrombocytopenia to non-immune cases of thrombocytopenia. *Pediatr Blood Cancer*, 45 (2): 176–183.
- Cariani L, Romano EL, Martínez N, Montaña R, Suarez G, Ruiz I, Soyano A. 1995. ABO-haemolytic disease of the newborn (ABO-HDN): factors influencing its severity and incidence in Venezuela. *J Trop Pediatr*, 41(1): 14-21.
- Chávez GF, Mulinare J, Edmonds LD. 1991. Epidemiology of Rh hemolytic disease of the newborn in the United States. *JAMA*; 265: 3270-3274.
- Chow M, Sun K, Yung C, Hu H, Tzeng J, Lee D. 1992. Neonatal alloimmune thrombocytopenia due to HLA-A2 antibody. *Acta Haematologica*, 87: 153–155.
- del Rosario ML, Fox ER, Kickler TS, Kao KJ. 1998. Neonatal alloimmune thrombocytopenia associated with maternal anti-HLA antibody: a case report. *J Pediatr Hematol Oncol*, 20(3): 252-6.
- Dooren MC, van Kamp IL, Kanhai HH, Gravenhorst JB, von dem Borne AE, Engelfriet CP. 1993. Evidence for the protective effect of maternal FcR-blocking IgG alloantibodies HLA-DR in Rh D-haemolytic disease of the newborn. *Vox Sang*, 65 (1): 55-8.
- Dreyfus M, Morel-Kopp MC, Verdy E *et al.* 1993. Immune neonatal thrombocytopenia: Unexpected results of a multicentric prospective study in a non selected population [abstract]. *Blood*; 82: 2312.
- Eblen AC, Gercel-Taylor C, Shields LB, Sanfilippo JS, Nakajima ST, Taylor DD. 2000. Alterations in humoral immune responses associated with recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*, 73 (2): 305-313.

- Eckstein R. 2005. Immunhämatologie und Transfusionsmedizin. 5. Auflage. München:Urban und Fischer Verlag.
- Eichler H, Zieger W, Neppert J, Kerowgan M, Melchert F, Goldmann SF. 1995. Mild course of fetal RhD haemolytic disease due to maternal alloimmunisation to paternal HLA class I and II antigens. Vox Sang, 68 (4): 243-7.
- Engelfriet CP. 1993. Evidence for the protective effect of maternal FcR-blocking IgG alloantibodies HLA-DR in Rh D-haemolytic disease of the newborn. Vox Sang, 65 (1): 55-8.
- Falk C, Gerhard I, Mytilineos J, Daniel V. 1993. Immunologische Störungen bei Frauen mit habituellen Aborten. Gynecology and Obstetrics, 254: 1286-1288.
- Feinman A, Kliman J, Main K. 1987. HLA antigen expression and induction by interferon in cultured human trophoblasts. Am J Obstet Gynecol, 157: 1429-1434.
- Fisher M, Chapman JR et al. 1985. Alloimmunisation to HLA Antigens following Transfusions with Leucocyte-Poor and Purified Platelet Suspensions. Vox Sang, 49: 331–335.
- Fleischauer. 2007. Rationelle Diagnostik bei frühem Abort - Ursachenspektrum, Hämostasiologie, Endokrinologie, Immunologie, Serologie und Genetik [Fachinformation]. Labor Fleischauer. Wiesbaden.
- Fontana S. 2009. Die «Blutgruppen» der Thrombozyten und Leukozyten: Bedeutung in der Transfusionsmedizin und Immunhämatologie. Pipette, 4: 21-23.
- Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C, Ritter J. 2005. Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. Springer Berlin, Heidelberg.



- Geifman-Holtzman O, Wojtowycz M, Kosmas E, Artal R. 1997. Female alloimmunisation with antibodies known to cause hemolytic disease. *Obstet Gynecol*, 89: 272-5.
- Ghevaert C, Campbell K, Walton J, Smith GA, Allen D, Williamson LM, Ouwehand WH, Ranasinghe E. 2007. Management and outcome of 200 cases of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*, 47(5): 901-10.
- Giers G, Riethmacher R, Wenzel F, Tutschek B. 2010. Die fetale/neonatale Alloimmun-Thrombozytopenie (FNAIT). *Geburtsh Frauenheilk*, 70(7): 539-543.
- Gramatges MM, Fani P, Nadeau K, Pereira S, Jeng MR. 2009. Neonatal alloimmune thrombocytopenia and neutropenia associated with maternal human leukocyte antigen antibodies. *Pediatr Blood Cancer*, 53(1): 97-9.
- Harrington WJ, Sprague CC, Minnich V, Moore CV, Aulvin RC, Dubach R. 1953. Immunologic mechanisms in neonatal and thrombocytopenic purpura. *Ann Intern Med*, 38: 433–469.
- Harris Re, Lordon Re. 1976. The Association of Maternal Lymphocytotoxic Antibodies With Obstetric Complications. *Obstetrics & Gynecology*, 48(3): 302-304.
- Heuft HG. 2007. Klinische Transfusionsmedizin. Herstellung von Blutprodukten. Verfügbare Blutprodukte. Institut für Transfusionsmedizin, Medizinische Hochschule Hannover. [Vortrag]. Hannover.
- Hoch J. 1994. Zur pränatal transfusionspflichtigen fetalen Erythroblastose infolge fetomaternaler Blutgruppeninkompatibilität: Drei Studien über Spezifität, Häufigkeit und Induktion erythrozytärer Antikörper sowie über sich daraus für die Behandlung ableitende Konsequenzen.[Dissertation]. Bonn.

- Jhawar BS, Ranger A and Steven D *et al.* 2003. Risk Factors for Intracranial Hemorrhage among Full-term Infants: A Case-Control Study. *Neurosurgery Online*, 52(3): 581-590.
- Johnson JM, Ryan G, Al-Musa A, Farkas S, Blanchette VS. 1997. Prenatal Diagnosis and Management of Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia. *Seminars in Perinatology*, 21(1): 45-52.
- Kaplan C. 2003. Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Orphanet Encyclopedia*, Nov./03.
- Kenneth J, Moise JR. 2000. Non-anti-D antibodies in red-cell alloimmunization. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 92(1): 75-81.
- Killie MK, Kjeldsen-Kragh J, Husebekk A, Skogen B, Olsen JA, Kristiansen IS. 2007. Cost-effectiveness of antenatal screening for neonatal alloimmune thrombocytopenia. *BJOG*, 114(5): 588-95.
- King KE, Kao KJ, Bray PF, Casella JF, Blakemore K, Callan NA, Kennedy SD, Kickler TS. 1996. The role of HLA antibodies in neonatal thrombocytopenia: a prospective study. *Tissue Antigens*, 47(3): 206-211.
- Kitschke HJ, Poschmann A, Carstensen M, Sprotte C, Fischer K, Schreier I. 1985. *Pränatale Diagnostik und Therapie des Morbus haemolyticus fetalis bei Rhesus-Inkompatibilität*. Geburtsh u. Frauenheilk, 45: 470-472. Georg Thieme Verlag Stuttgart - New York.
- Kjeldsen-Kragh J, Killie MK, Tomter G. 2007. A screening and intervention program aimed to reduce mortality and serious morbidity associated with severe neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood*, 110(3): 833–839.

Kjeldsen-Kragh J, Husebekk A, Killie MK, Skogen B. 2008. Is it time to include screening for neonatal alloimmune thrombocytopenia in the general antenatal health care programme? *Transfus Apher Sci.*, 38(3): 183-8.

Klein HG, Dzik S, Slichter SJ, Hillyer CD, Silberstein LE. 1998. Leukocyte-Reduced Blood Components: Current Status. *Hematology. American Society of Hematology Education Programm.*

Kurz M, Stöckelle E, Eichelberger B, Panzer S. 1999. IgG titer, subclass, and light-chain phenotype of pregnancy-induced HPA-5b antibodies that cause or do not cause neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*, 39(4): 379-82.

Lab28. 2006. Relevanz eines positiven Antikörpersuchtests (AKS) in der Schwangerschaft. *Lab 28 Magazin*, Dezember 2006.

Landsteiner K. 1901. Ueber Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. *Wiener Klinische Wochenschrift*.

Lefèvre G, Walther-Wenke J, Burkhard. 1999. Leukozytendepletion. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz*, 42: 121-131. Springer-Verlag.

Maas DH. 1992. Clinical aspects of prenatal prevention of rhesus incompatibility. *Infusionsther*, 30: 425-30.

Marín L, Torío A, Muro M, Fernandez-Parra R, Minguela A, Bosch V, Alvarez-López MR, García-Alonso AM. 2005. Alloimmune neonatal neutropenia and thrombocytopenia associated with maternal anti HNA-1a, HPA-3b and HLA antibodies. *Pediatr Allergy Immunol*, 16(3): 279-82.

Marzusch K, Schnaidt M. 1995. Diagnostik und Therapie der fetalen Alloimmunthrombozytopenie. *Geburtsh Frauenheilk*, 55(10): 587-591.

- Marzusch K, Steck T. 1998. Immunologische Vorgänge im Rahmen der Dezidualisation und beginnenden Plazentation. Implikationen für pathologische Schwangerschaftsverläufe. Gynäkologe, 31: 346-352. Springer-Verlag.
- Moncharmont P, Dubois V, Obegi C, Vignal M, Mérieux Y, Gebuhrer L, Rigal D. 2004. HLA Antibodies and Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia. Acta Haematol, 111: 215-220.
- Mueller-Eckhardt C, Kiefel V, Grubert A et al. 1989. 348 cases of suspected neonatal alloimmune thrombocytopenia. Lancet, 1: 363-366.
- Mueller-Eckhardt C, Kiefel V. 2004. Transfusionsmedizin Grundlagen–Therapie–Methodik. Dritte Aufl. Berlin: Springer.
- Murphy MF, Verjee S, Greaves M. 1999. Inadequacies in the postnatal management of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia (FMAIT). Br J Haematol, 105: 123–6.
- Muntau AC. 2007. Intensivkurs Pädiatrie. 4. Auflage. Urban und Fischer Verlag. München/Jena.
- Mutterschaftsrichtlinien des G-BA. 1985. Richtlinien des Bundesausschusses der Ärzte und Krankenkassen über die ärztliche Betreuung während der Schwangerschaft und nach der Entbindung („Mutterschafts-Richtlinien“) in der Fassung vom 10. Dezember 1985 (veröffentlicht im Bundesanzeiger Nr. 60 a vom 27. März 1986) zuletzt geändert am 13. September 2007, veröffentlicht im Bundesanzeiger Nr. 239: S. 8 326 vom 21. Dezember 2007, in Kraft getreten am 01. Januar 2008.
- Naidu S, Messmore H, Caserta V, Fine M. 1983. CNS lesions in neonatal isoimmune thrombocytopenia. Arch Neurol, 40: 552-554.

- Neppert J, von Witzleben-Schürholz E. 2007. Informationsblatt Neonatale Alloimmunthrombozytopenie (NAIT) [Informationsblatt]. Institut für Transfusionsmedizin des UK-Schleswig-Holstein.
- Nomura ML, Couto E, Martinelli BM, Barjas-Castro ML, Barini R, Passini R, Castro V. 2010. Fetal genotyping for platelets antigens: a precise tool for alloimmune thrombocytopenia: case report and literature review. Arch Gynecol Obstet. Springer Berlin/Heidelberg.
- Novotny VM, van Doorn R, Witvliet MD, Claas FH, Brand A. 1995. Occurrence of allogeneic HLA and non-HLA antibodies after transfusion of prestorage filtered platelets and red blood cells: a prospective study. Blood, Apr 1; 85(7): 1736-41.
- Obladen M, Maier RF, Barthlen W, Stiller B. 2006. Neugeborenenintensivmedizin: Evidenz und Erfahrung. Siebte Aufl. Springer Medizin Verlag. Heidelberg.
- Orgad S, Loewenthal R, Gazit E, Sadetzki S, Novikov I, et al. 1999. The prognostic value of anti-paternal antibodies and leukocyte immunizations on the proportion of live births incouples with consecutive recurrent miscarriages. Hum Reprod, 14(12): 2974-2979.
- Payne R, Rolfs M. 1958. Feto-maternal leukocyte incompatibility. Clin Invest 37: 1756.
- Payne R, Tripp M. 1962. The Development and Persistence of Leukoagglutinins in Parous Women. Blood, 19: 411-424.
- Pöhlmann TG. 2006. Interaktion von Trophoblasten- und natürlichen Killerzellen an der fetomaternalen Grenzfläche. [Dissertation]. Jena.

- Pöhlmann TG, Fitzgerald JS, Busch S, Schleussner E, Gutiérrez G, Blois S, Arck PC, Engert S, Kämmerer U, Szekeres-Bartho J, Markert UR. 2006. Reproductive Immunology – an Update. *Transfus Med Hemother*, 33: 474-485.
- Porter TF, LaCoursiere Y, Scott JR. 2006. Immunotherapy for recurrent miscarriage (review). *The Cochrane Library*, 2.
- Proulx C, Filion M, Goldman M, Bradley A, Devine D, Décary F, Chartrand P. 1994. Analysis of immunoglobulin class, IgG subclass and titre of HPA-1a antibodies in alloimmunized mothers giving birth to babies with or without neonatal alloimmune thrombocytopenia. *British Journal of Haematology*, 87(4): 813–817.
- Puri S, Shieh DC, Canavan A, Kao KJ. 1993. Quantitation and characterization of plasma HLA in neonates of different gestational ages. *Tissue Antigens*, 42: 67–71.
- Rhyne P. 2007. Comparative analysis of single and multiplexed assays [Vortrag]. Bristol–Meyers Squibb Company.
- Roberts I, Murray NA. 2003. Neonatal thrombocytopenia: causes and management. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.*;88(5): F359-64.
- Roth I. 2008. Charakterisierung von Antikörpern in Säure-Eluaten aus irreversibel abgestoßenen Nierentransplantaten [Dissertation]. Medizinische Fakultät der Universität Duisburg-Essen.
- Sasaki M, Yagihashi A, Kobayashi D, Watanabe N, Fujikawa T, Chiba S, Sato S, Morishita K, Sekimoto T, Ikeda H. 2001. Neonatal alloimmune thrombocytopenia due to anti-human leukocyte antigen antibody: a case report. *Pediatr Hematol Oncol*, 18(8): 519-24.

Scharinger D. 1997. Transfusionsmedizin, 12: 6.

Schellong G. 1964. Über den Einfluß mütterlicher Antikörper des ABO-Systems auf Reticulocytenzahl und Serumbilirubin bei Frühgeborenen. *European Journal of Pediatrics*, 90 (2): 134-149.

Schleussner E, Rummler S, Huebler A, Barz D. 2009. Successful treatment of a fetal alloimmunthrombocytopenia caused by HLA-B7 using immunoadsorption onto Protein-A. *Thrombosis Research*, 123 (2): 146.

Schulman NR, Marder VJ, Heller MC. 1964. Platelet and leukocyte isoantigens and their antibodies: Serologic, physiologic and clinical studies. *Prog Hematol* 4: 222-304.

Singh SA, Pollard J, Singhal N. 2005. Fetomaternal alloimmune thrombocytopenia presenting as intracerebral bleeding in utero. *Indian J Pediatr*, 72 (4): e35-e37.

Spencer JA, Burrows RF. 2001. Feto-maternal alloimmune thrombocytopenia: a literature review and statistical analysis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 41: 45–55.

Starcevic M, Tomicic M, Malenica M, Zah-Matakovic V. 2009. Neonatal alloimmune thrombocytopenia caused by anti-HLA-A24 alloantibodies. *Acta Pædiatrica*, 99 (4): 630-632.

Stirrat GM. 1990. Recurrent miscarriage I: Definition and epidemiology. *Lancet*, 336: 673-675.

Taaning E. 2000. HLA Antibodies and Fetomaternal Alloimmune Thrombozytopenia: Myth or Meaningful?. *Transfusion Medicine Reviews* 114(3): 275-280.

- Tempfer C, Kurz C, Vytiska-Binstorfer E. 2000. Neue Daten zur Ätiologie des habituellen Aborts: eine Übersicht. *Geburtsh Frauenheilk*, 60: 604-608. Georg Thieme Verlag. Stuttgart - New York.
- Terasaki PI, McClelland JD. 1964. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature*, 204: 998.
- Terasaki PI; Mickey MR; Yamazaki JN; Vredevoe D. 1970. Maternal-Fetal Incompatibility: Incidence of HL-A Antibodies and Possible Association with Congenital Anomalies. *Transplantation*, 9(6): 538-543.
- Thude H, Schorner U, Helfricht C, Loth M, Maak B, Barz D. 2006. Neonatal alloimmune thrombocytopenia caused by human leucocyte antigen-B27 antibody. *Transfus Med.*;16(2): 143-9.
- Tongio MM, Mayer S, Lebec A. 1975 Transfer of HLA-antibodies from the mother to the child. *Transplantation* 20: 163-166.
- van de Watering LMG, Hermans J, Houbiers J, van den Broek P, Bouter H, Boer F, Harvey MS, Huysmans H, Brand A. 1998. Beneficial Effects of Leukocyte Depletion of Transfused Blood on Postoperative Complications in Patients Undergoing Cardiac Surgery. *Circulation*. 97: 562-568.
- van Rood J, Eernisse J, van Leeuwen A. 1958. Leukocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature* 181: 1735.
- van Rood J, van Leeuwen, Eernisse JG. 1959. Leucocyte antibodies in sera of pregnant women. *Vox Sang*, 4: 427-44.
- Vaughan JI, Manning M, Warwick RM, Letsky EA, Murray NA, Roberts IAG. 1998. Inhibition of erythroid progenitor cells by anti-Kell antibodies in fetal alloimmune anaemia. *N Engl J Med*, 338: 798-803.



Warburton D, Fraser FC. 1964. Spontaneous abortion risk in man: Data from reproductive histories collected in a medical genetics unit. Am J Hum Genet 16: 1-9.

Warburton D, Naylor AF. 1971. The effect of parity on placental weight and birth weight: An immunological phenomenon? A report of the collaborative study of cerebral palsy. Am J Hum Genet, 23: 41.

Weinstein L. 1982. Irregular antibodies causing hemolytic disease of the newborn: a continuing problem. Clin Obstet Gynecol, 25: 321-32.

## 8 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Untersuchungsprotokoll.....</i>	<i>14</i>
<i>Abbildung 2: Pipettierschema ABO- und Rh-Formelbestimmung .....</i>	<i>21</i>
<i>Abbildung 3: Pipettierschema PAK® 2-LE .....</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 4: Pipettierschema PAKPLUS®.....</i>	<i>29</i>
<i>Abbildung 5: Prinzip des MAIPA-Assays (Scharinger 1997) .....</i>	<i>30</i>
<i>Abbildung 6: Testergebnisse und Titer der 21 Schwangeren mit HLA- bzw. HPA-Antikörpern .....</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 7: absolute Häufigkeit der untersuchten Antikörper in der Kohorte .....</i>	<i>35</i>
<i>Abbildung 8: Häufigkeit der Antikörper gegen HLA Klasse I und II.....</i>	<i>35</i>
<i>Abbildung 9: Beeinflussung des Schwangerschaftsverlaufs bzgl. Abort/Lebendgeburt durch HLA-Antikörper im mütterlichen Serum .....</i>	<i>37</i>
<i>Abbildung 10: Beeinflussung des Schwangerschaftsverlaufs bzgl. Abort/Lebendgeburt durch HPA-Antikörper im mütterlichen Serum .....</i>	<i>38</i>
<i>Abbildung 11: vorhergehende Schwangerschaften in der untersuchten Kohorte .....</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 12: Häufigkeit von HPA-Antikörpern in den Gruppen "weniger als drei frühere Schwangerschaften" und "mindestens drei frühere Schwangerschaften".....</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 13: Häufigkeit früherer Aborte in der untersuchten Kohorte.....</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 14: HLA-Antikörper bei Frauen mit drei oder mehr vorhergehenden Aborten und bei Frauen mit weniger als drei Aborten in der Anamnese .....</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 15: Titerverlauf der HLA-Antikörper Klasse I bei Probandin #10.....</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 16: Titerverlauf der HLA-Antikörper Klasse I und II bei Probandin #19.....</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 17: Titerverlauf der HLA-Antikörper Klasse I bei Probandin #56.....</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 18: Titerverlauf der HLA-Antikörper Klasse I bei Probandin #23.....</i>	<i>52</i>
<i>Abbildung 19: Titerverlauf der HLA-Antikörper Klasse I und II sowie des Anti-HPA 5 Antikörpers bei Probandin #109 .....</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 20: Titerverlauf des Anti-HPA 1a Antikörpers bei Probandin #42 .....</i>	<i>54</i>

## 9 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Häufigkeit von HLA-Antikörpern in der Schwangerschaft .....</i>	<i>10</i>
<i>Tabelle 2: Häufigkeit von HLA-Antikörpern in den Gruppen der Prima- und Multigravidae.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabelle 3: Häufigkeit von HLA-Antikörpern in der Gruppe der Frauen mit ein oder zwei früheren Schwangerschaften sowie in der Gruppe der Multigravidae .....</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 4: HPA-Antikörper bei Frauen mit habituellen Aborten sowie bei Frauen mit weniger als drei vorhergehenden Aborten.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabelle 5: Titer der HLA-Antikörper Klasse I sowie des Anti-HPA 5b Antikörpers bei Probandin #43 .....</i>	<i>52</i>

## 10 Anhang

## Ergebnisse tabellarisch

Prob.-ID	SS	vorherg. Geburten	vorherg. Aborte	vorherg. Interr.	Blutgruppe	Rh-Formel	Combs-Test	Enzym	Quick-Screen	B-Screen	PAK 2LE/CT-Ges. ohne DTT	HLA-Ak Titler	PAK Plus/ Maipa	LABScMix Klasse I	LABScMix Klasse II	Single I	Single II	Besonderheiten
1A	8	0	0	0	0	O	CcDee	neg	neg	neg	neg							o.B.
1B	26							neg	neg	neg	neg							o.B.
2A	8	1	1	0	0	A	CcDEe	neg	neg	neg	neg							o.B.
2B	25							neg	neg	neg	neg							o.B.
3A	9	0	0	0	0	O	ccdee	neg	neg	neg	neg							o.B.
3B	28							neg	neg	neg	neg							o.B.
6A	6	4	1	3	0	O	ccDEe	neg	neg	neg	neg			pos	neg	B27.61		Blutung in Früh-SS, sonst o.B.
6B	19							neg	neg	neg	neg							o.B.
6C	25							neg	neg	neg	neg							o.B.
7A	5	0	0	0	0	O	CcDee	neg	neg	neg	neg							o.B.
7B	24							neg	neg	neg	neg							o.B.
8A	9	1	1	0	0	O	ccdee	neg	neg	neg	neg							o.B.
8B	24							neg	neg	neg	neg			pos	pos	A29.30.11.C	DR 51.52	Abort 10 SSW
9A	8	1	1	0	0	A	CcDee	neg	neg	neg	pos							o.B.
9B	13							neg	neg	neg	pos							o.B.
10A	9	1	1	0	0	O	ccDEE	neg	neg	pos	neg							o.B.
10B	13							neg	neg	pos	neg							o.B.
10C	26							neg	neg	pos	neg							o.B.
10D	34							neg	neg	pos	neg			pos	neg	unspez.		Kind mit VSD, sonst o.B.
11A	10	2	1	1	0	B	CcDee	neg	neg	neg	neg							o.B.
11B	25							neg	neg	neg	neg							o.B.
12A	6	1	0	1	0	O	ccDEe	neg	neg	neg	neg							o.B.
13A	9	1	1	0	0	O	ccDEe	neg	neg	neg	neg							o.B.
13B	28							neg	neg	neg	neg							o.B.
15A	8	0	0	0	0	A	CcDee	neg	neg	neg	neg							o.B.
15B	26							neg	neg	neg	neg							o.B.
16A	9	3	1	2	0	O	ccDee	neg	neg	neg	neg							o.B.
16B	26							neg	neg	neg	neg							o.B.
17A	7	0	0	0	0	AB	CCDee	neg	neg	neg	neg							o.B.
17B	26							neg	neg	neg	neg							o.B.
18A	7	2	0	1	1	A	ccdee	neg	neg	neg	neg							o.B.
18B	26							neg	neg	neg	neg							o.B.
19A	6	1	1	0	0	B	CCDee	neg	neg	pos	neg							o.B.
19B	26							neg	neg	pos	neg							o.B.
19C	34							neg	neg	pos	neg							o.B.
20A	7	0	0	0	0	A	CCDee	neg	neg	neg	neg							o.B.
20B	26							neg	neg	pos	neg							o.B.
21A	8	0	0	0	0	B	ccDEe	neg	neg	neg	neg							o.B.
22A	7	1	1	0	0	A	ccDEe	neg	neg	neg	neg							o.B.
22B	26							neg	neg	neg	neg							o.B.
23A	10	0	0	0	0	B	CcDee	neg	neg	pos	neg							o.B.
23B	25							neg	neg	pos	neg							o.B.
23C	37							neg	neg	pos	neg							o.B.
24A	8	3	3	0	0	A	CcDee	neg	neg	neg	neg							o.B.
24B	26							neg	neg	neg	neg							o.B.
25A	9	0	0	0	0	B	CCDee	neg	neg	neg	neg							o.B.
25B	26							neg	neg	neg	neg							o.B.
26A	8	4	1	2	1	O	ccDEe	neg	neg	neg	neg							o.B.
26B	25							neg	neg	neg	neg							o.B.
27A	6	0	0	0	0	A	CcDEe	neg	neg	neg	neg							o.B.
27B	27							neg	neg	neg	neg							o.B.
28A	6	0	0	0	0	O	ccDEe	neg	neg	neg	neg							o.B.
28B	28							neg	neg	neg	neg							o.B.
29A	5	1	1	0	0	O	ccDEe	neg	neg	neg	neg							o.B.
29B	24							neg	neg	neg	neg							o.B.
30A	5	1	1	0	0	O	ccdee	neg	neg	neg	neg							o.B.
30B	24							neg	neg	neg	neg							o.B.
31A	6	0	0	0	0	O	ccDEe	neg	neg	neg	neg							o.B.
31B	28							neg	neg	neg	neg							o.B.
32A	6	0	0	0	0	A	CcDee	neg	neg	neg	neg							o.B.
32B	28							neg	neg	neg	neg							o.B.
33A	5	2	2	0	0	A	CCDee	neg	neg	neg	neg							o.B.
33B	27							neg	neg	neg	neg							o.B.
34A	7	2	2	0	0	B	ccdee	neg	neg	pos	neg							o.B.
34B	20							neg	neg	pos	neg							o.B.
35A	5	0	0	0	0	A	CcDee	neg	neg	neg	neg							o.B.
36A	8	0	0	0	0	AB	ccdee	neg	neg	neg	neg							o.B.
36B	26							neg	neg	neg	neg							o.B.
37A	9	0	0	0	0	A	CcDee	neg	neg	neg	neg							o.B.
37B	28							neg	neg	neg	neg							o.B.
38A	4	1	1	0	0	O	CCDee	neg	neg	neg	neg							o.B.
38B	24							neg	neg	pos	neg							o.B.
39A	6	1	1	0	0	O	CCDee	neg	neg	neg	neg							o.B.
39B	26							neg	neg	neg	neg							o.B.
40A	5	0	0	0	0	O	CcDEe	neg	neg	neg	neg							o.B.
40B	29							neg	neg	neg	neg							o.B.
41A	7	0	0	0	0	A	CcDee	neg	neg	neg	neg							o.B.
41B	25							neg	neg	neg	neg							o.B.
42A	8	3	0	3	0	O	CCDee	neg	neg	neg	neg							o.B.
42B	18							neg	neg	neg	neg							o.B.
42C	28							neg	neg	neg	neg							o.B.
42D	35							neg	neg	neg	neg							o.B.
43A	5	2	2	0	0	A	CCDee	neg	neg	neg	neg							o.B.
43B	24							neg	neg	pos	neg							o.B.
43C	31							neg	neg	pos	neg							o.B.
44A	8	0	0	0	0	B	ccDEe	neg	neg	neg	neg							o.B.
44B	25							neg	neg	neg	neg							o.B.
45A	9	1	0	0	1	A	CCDee	neg	neg	neg	neg							o.B.
45B	24							neg	neg	neg	neg							o.B.
46A	8	0	0	0	0	O	ccdee	neg	neg	neg	neg							o.B.
46B	25							neg	neg	neg	neg							o.B.
48B	7	2	1	1	0	A	CcDEe	neg	neg	neg	neg							o.B.
48B	24							neg	neg	neg	neg							o.B.
49A	7	0	0	0	0	A	CCDee	neg	neg	neg	neg							o.B.
49B	24							neg	neg	neg	neg							o.B.
50A	8	0	0	0	0	AB	CcDEe	neg	neg	neg	neg							o.B.
50B	27							neg	neg	neg	neg							o.B.
51A	9	1	1	0	0	B	CcDee	neg	neg	neg	neg							o.B.
51B	26							neg	neg	neg	neg							o.B.
52A	5	0	0	0	0	O	CcDEe	neg	neg	neg	neg							o.B.
52B	28							neg	neg	neg	neg							o.B.
53A	6	0	0	0	0	O	ccdee	neg	neg	neg	neg							o.B.
53B	26							neg	neg	neg	neg							o.B.
54A	10	2	1	1	0	B	CcDee	neg	neg	neg	neg							o.B.
54B	25							neg	neg	neg	neg							o.B.
55A	11	1	1	0	0	B	CcDee	neg	neg	neg	neg							o.B.
55B	26							neg	neg	neg	neg							o.B.

Ulrike Pfeiffer

## Aufklärung zur Studie:

### **Suche, Differenzierung und Titerverlaufsbestimmung von erythrozytären, thrombozytären und HLA-Antikörpern im Serum schwangerer Frauen**

**Ansprechpartner:**

Frau Prof. Dr. D. Barz, Frau OÄ Dr. H. Jütte, Cand. med. U. Pfeiffer

**Studienteilnehmer**

Name:

Geburtsdatum:

Klinik:

Sehr geehrte Studienteilnehmerin,

das Institut für Transfusionsmedizin der Friedrich Schiller Universität Jena führt eine Studie durch, in der Antikörper (Ak) gegen Erythrozyten und Thrombozyten sowie HLA-Antikörper im Blut schwangerer Frauen mit positivem Ak-Suchtest in der Routinediagnostik gesucht und bei deren Vorliegen differenziert und quantifiziert werden sollen.

**Ziel der Studie:**

Suche nach Zusammenhängen zwischen dem Auftreten erythrozytärer, thrombozytärer und HLA-Antikörper in der Schwangerschaft

Vielleicht haben Sie bereits von der Rhesusunverträglichkeit gehört. Dort bildet die Mutter, wenn kindliches Blut in ihren Kreislauf übertritt, Antikörper gegen kindliche Blutgruppenmerkmale, welche in ihrem Blut nicht vorkommen (das Kind hat sie vom Vater geerbt). Gelangen diese Antikörper über die Plazenta zurück in den Feten, kann das unter Umständen zu schweren Anämien ( zu wenig sauerstofftransportierende Erythrozyten) oder gar zum Abort führen.

Ganz ähnlich verhält es sich mit der Bildung von Antikörpern gegen Thrombozytenantigene. Werden die Thrombozyten des Kindes durch mütterliche Antikörper zerstört, können im schlimmsten Fall Hirnblutungen und Blutungen innerer Organe mit möglicherweise lebenslangen Behinderungen (z.B. spastische Lähmungen, Blindheit) entstehen.

Die Rolle der Antikörperbildung gegen „fremde“ HLA-Antigene (HLA = humane Leukozytenantigene; finden sich auf einer Vielzahl von Körperzellen) ist noch nicht im Detail aufgeklärt. Man vermutet jedoch, dass viele Schwangere, vor allem Mehrfachgebärende, Antikörper gegen die HLA-Strukturen des Kindes bilden.

Zur Routinediagnostik im Rahmen einer Schwangerschaft gehört heute – neben einer Blutgruppenbestimmung einschließlich Rhesusfaktor – auch ein Screening nach erythrozytären Antikörpern und dessen Wiederholung zwischen der 24. und 27.SSW. Nach Antikörpern gegen Thrombozyten bzw. gegen HLA-Antigene wird nicht gesucht.

In der vorliegenden Studie soll deshalb durch monatliche Blutentnahmen und daraus erfolgreicher Antikörpersuche herausgearbeitet werden, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten der genannten Antikörper gibt.

Zu diesem Zweck werden Ihnen, sofern Sie sich einverstanden erklären, neben dem Blut für die Routinebestimmungen 20 ml Nativblut zusätzlich abgenommen ( Sie werden dafür nicht zusätzlich gestochen).

Die möglichen Risiken und Nebenwirkungen entsprechen denen einer normalen venösen Blutabnahme (Infektionen, Hämatome an der Einstichstelle; kurz anhaltende Blutung, nachdem die Nadel herausgezogen wurde; Verletzung benachbarter Nerven und Gefäße).

Die Blutprobe wird dann zunächst auf vorliegende Antikörper untersucht. Ist das Ergebnis positiv, wird aus derselben Probe der Antikörper genau differenziert und sein Titer bestimmt. In monatlichen Abständen wird nun der Titer kontrolliert.

Bei negativem Antikörper-Suchtest erfolgt jeweils im Abstand von einem Monat ein erneuter Suchtest.

Um die Ergebnisse der Untersuchungen umfassend auswerten zu können, werden außerdem Ihre Krankenakten herangezogen.

Ihre persönlichen Daten werden selbstverständlich streng vertraulich behandelt, verschlüsselt und nicht weitergegeben.

Wir würden uns sehr freuen, wenn Sie uns bei der Aufklärung fetomaternaler Unverträglichkeiten mit ihren Blutproben unterstützen!

Falls Sie nicht an dieser Studie teilnehmen möchten, wird Ihnen das selbstverständlich keine Nachteile bereiten. Sie können Ihre Zustimmung jederzeit zurückziehen.

---

Datum

---

Unterschrift Patient

---

Unterschrift Arzt

## Einverständniserklärung zur Studie:

**Suche, Differenzierung und Titerverlaufsbestimmung von thrombozytären und HLA-Antikörpern bei Schwangeren mit positivem Erythrozyten-Antikörper-Suchtest sowie Differenzierung und Quantifizierung der erythrozytären Antikörper**

### Studienteilnehmer

Name:

Geburtsdatum:

Klinik:

Hiermit gestatte ich die Abnahme von Blut zu Forschungszwecken für die oben angegebene Studie. Ich erkläre, dass ich mit der im Rahmen der klinischen Prüfung notwendigen Aufzeichnungen von Krankheitsdaten/Studiendaten und ihrer anonymisierten Weiterverarbeitung in Form von wissenschaftlichen Veröffentlichungen einverstanden bin. Mir ist bewusst, dass ich jederzeit von der Studie zurücktreten kann.

Ich bin mit den laut Aufklärung genannten Untersuchungen/Datenerhebungen einverstanden.

☐ Ja

☐ Nein

Ich bin umfassend über Ziele und Zweck der Studie aufgeklärt und habe keine weiteren Fragen mehr.

☐ Ja

☐ Nein

\_\_\_\_\_  
Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Patient

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Arzt



Datum:

## Stammdatenblatt

Bitte beantworten Sie folgende Fragen. Sie müssen natürlich nur die Fragen beantworten, die Sie möchten.

Name:

Vorname:

Adresse:

Telefonnummer:

behandelnder Gynäkologe:

1. Haben Sie momentan gesundheitliche Beschwerden irgendeiner Art (z.B. Erkältung, Kopf- o. Gliederschmerzen)?

2. Leiden Sie an einer Grunderkrankung wie z.B. Diabetes mellitus, Bluthochdruck, Allergie, Erkrankung aus dem rheumatischen Formenkreis, Asthma bronchiale u.s.w.?

3. Wurden Sie schon einmal operiert? Wenn ja, was war es für eine Op, in welchem Jahr und in welcher Klinik wurde sie durchgeführt?

4. Erhielten Sie schon einmal eine Bluttransfusion? Wenn ja, wie oft, wann und wo erhielten Sie diese?

5. Müssen Sie regelmäßig Medikamente einnehmen? Wenn ja, welche Medikamente?

6. In welcher Schwangerschaftswoche sind Sie momentan?

7. Waren Sie vor dieser Schwangerschaft schon einmal schwanger? Wenn ja, wie oft?

8. Traten bei eventuell vorhergehenden Schwangerschaften und Geburten irgendwelche Komplikationen bei Ihnen oder dem Kind auf?

9. Mussten Sie schon einmal eine Fehlgeburt erleiden? Wenn ja, wie oft und in welcher Schwangerschaftswoche?

10. Wurde bei Ihnen schon einmal eine Schwangerschaft abgebrochen?

11. Ist Ihnen die Blutgruppe des Kindsvaters, z.B. aus dem Nothilfepass, bekannt?

**Ethikvotum****Bearbeitungsnummer: 2140-10/07**

Sehr geehrte Frau Kollegin,

in ihrer Sitzung am 25.10.2007 hat die Ethik-Kommission der Friedrich-Schiller Universität Ihren Antrag

*Suche Differenzierung und Titerverlaufsbestimmung von erythrozytären, thrombozytären und HLA-Antikörpern im Serum Schwangerer Frauen*

beraten und erhebt aus ethischer Sicht keine Bedenken.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. med. U. Brandl

Stellv. Vorsitzender der Ethik-Kommission

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Katja Ulrike Pfeiffer  
Geburtsdatum: 14. Mai 1985  
Geburtsort: Weimar  
Familienstand: ledig  
Adresse: Bachstraße 20a  
99444 Blankenhain

### Schulausbildung

08/ 1991 – 08/ 1995 Grundschole II Blankenhain  
09/ 1995 – 06/ 2003 Marie-Curie-Gymnasium Bad Berka/Blankenhain  
(Schulteil Blankenhain)  
Abschluss mit der Gesamtnote 1,2 (sehr gut)

### Studium

09/ 2003 – 09/ 2005 Vorklinischer Abschnitt des Medizinstudiums an der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
Gesamtnote: 1,5 (sehr gut)  
09/ 2005 – 07/ 2008 Klinischer Abschnitt des Medizinstudiums an der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena  
08/ 2008 – 07/ 2009 Praktisches Jahr  
10/ 2009 – 12/ 2009 Abschluss des Studiums mit dem  
Zweitem Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
Gesamtnote: 1,5 (sehr gut)

### Beruflicher Werdegang

seit 01/2010 Assistenzärztin in der Abteilung für Innere Medizin in der  
HELIOS Klinik Blankenhain

---

Unterschrift

---

Ort, Datum

### **Danksagung**

Für die Bereitstellung des Themas sowie für die ausgezeichnete Betreuung während der Bearbeitung möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. D. Barz und bei Frau OÄ Dr. H. Jütte bedanken.

Weiterhin danke ich herzlichst Herrn Dr. Oberle, Herrn Dr. Thude, Herrn Dr. Michael sowie allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Blutbank und des HLA-Labors des Universitätsklinikums Jena, die mir bei der Durchführung der Untersuchungen stets zur Seite standen.

Für die Teilnahme an der Studie und der damit verbundenen Mehrarbeit durch die Befragung der Schwangeren, deren Aufklärung und die Blutentnahmen danke ich herzlichst Frau Dr. Eisenwinder, Frau Dr. Martin, Frau Dr. Glaubrecht, Frau Dr. Liesaus und Herrn Dr. Rangnick sowie deren Mitarbeiterinnen. Ohne ihre verlässliche Mitarbeit wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ein weiterer Dank geht an das Labor Löbel/Retzlaff in Jena, welches stets den reibungslosen und schnellen Probentransport ermöglichte.

Herrn Prof. Dr. Schleußner, Herrn Dr. Grauel, Herrn Dr. Rusche, Herrn Dr. Ullrich und Herrn Dr. Bechler danke ich für die unkomplizierte Bereitstellung von Patientendaten, die zur Auswertung der Ergebnisse nötig waren.

Für die Hilfestellungen im Umgang mit SPSS und speziellen statistischen Fragen möchte ich mich bei Herrn Dr. Walther vom Institut für Medizinische Statistik des Universitätsklinikums Jena bedanken.

Ein großer Dank geht an meine Familie, ohne deren bedingungslose Unterstützung mein Studium sowie diese Arbeit nicht möglich gewesen wären. Meinem Freund danke ich für die unermüdliche Hilfe bei jeglichen Computerproblemen.

**Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass

mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau Prof. Dr. D. Barz, Herr Prof. Dr. E. Schleußner, Frau OÄ Dr. H. Jütte, Herr Dr. V. Oberle, Herr Dr. H. Thude, Herr Dr. Walther, Frau Helfricht, Frau Hildebrandt, Frau Pfeiffer.

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und,

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ulrike Pfeiffer

Ort, Datum